Aus dem Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt an oxydierten und reduzierten Triphosphopyridinnucleotiden in Rattenlebern unter normalen und pathologischen Bedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Ulrich Schulz
aus Schwiebus

1970

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt an oxydierten und reduzierten Triphosphopyridinnucleotiden in Rattenlebern unter normalen und pathologischen Bedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Ulrich Schulz
aus Schwiebus

Dekan : Professor Dr.med. Herbert L a x

Referent : Professor Dr.med. Diether N e u b e r t

Korreferent: Professor Dr.med. Helmut C o p e r

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 29. JAN. 1970

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A. Einleitung

B. Methodik

I. Zellfraktionierung

II. Proteinbestimmung

III. Extraktionsverfahren der Triphosphopyridinnucleotide

1.) Allgemeines

2.) Extraktionsverfahren bei der "Aufarbeitung des Homogenates" und der "Zellfraktionierung"

3.) Testansätze zur Verdeutlichung der Glutathionwirkung

4.) Extraktionsverfahren bei der "Gefrierstop-Methode"

5.) Prüfung der Anwendbarkeit des Extraktionsverfahrens durch Testansätze

6.) Kritische Betrachtung zur Extraktion der Pyridinnucleotide in schwach saurem Milieu

C. Ergebnisse und Diskussion

I. $NADP^+$ - und $NADPH+H^+$ - Werte unter Normalbedingungen in der Summe der Zellfraktionen bei unterschiedlichen Nicotinamidkonzentrationen im Aufbereitungsmedium

II. Vergleichende Bestimmung des NADP-Gehaltes im Lebergewebe

1.) Werte nach der Gefrierstop-Methode

2.) Werte im Homogenat

III. Untersuchungen des NADP-Gehaltes der Leber unter pathologischen Bedingungen und unter dem Einfluß einiger Pharmaka

1.) Einfluß von Nicotinamid-Gaben i n v i v o auf den NADP-Gehalt der Leber

a) NADP-Gehalt nach einmaliger Gabe von Nicotinamid

b) NADP-Gehalt nach mehrfacher Gabe von Nicotinamid

2.) Einfluß von 6-Amino-Nicotinamid auf den NADP-Gehalt im Lebergewebe

3.) Einfluß einer Ischämie auf den NADP-Gehalt der Leber

a) NADP-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" unter dem Einfluß einer Ischämie bei $+2^{\circ}C$

b) NADP-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" unter dem Einfluß einer Ischämie bei $+37^{\circ}C$

D. Zusammenfassung

E. Literatur

A. Einleitung

NAD* (DPN) und NADP* (TDN) stellen mit ihren entsprechenden reduzierten Formen Redoxsysteme dar, die als Kofaktoren an einer großen Zahl biochemischer Reaktionen im Intermediärstoffwechsel beteiligt sind. NADP ist z.B. an Reaktionen beteiligt, die Isocitrat umsetzen - ein Intermediärprodukt des Tricarbonsäurecyclus. Es ist Co-Faktor der Glucose - 6 - Phosphatdehydrogenase (G-6-P-DH) und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-P-G-DH) - Reaktionsschritten im Pentosephosphatcyclus -, und es wird weiterhin bei Reaktionen der Fettsäuresynthese, der Umwandlung von Ribonucleotiden zu Desoxyribonucleotiden, zu oxydativen Umwandlungen an vielen Arzneimitteln und an einigen Steroiden (Leber, Mikrosomen; BRODIE, 6; AXELROD, 18) und anderen Stoffwechselschritten benötigt.

Während NAD vorwiegend bei dehydrierenden, abbauenden Reaktionen fungiert, ist NADP auch an vielen hydrierenden, synthetisierenden biologischen Reaktionen beteiligt (KLINGENBERG, 16). Pentose-Phosphat-Cyclus und Isocitrat-Oxydation sind die Hauptquellen der Bildung von reduziertem NADP (NADH + H^+). So werden bei jedem Durchlauf des Pentose-Phosphat-Cyclus (PPC) zwei Moleküle NADPH + H^+, bei jedem

---

*) Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid bzw. Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat.

Durchlaufen des Citrat-Cyclus ein Molekül NADPH + H^+ gebildet. Da die Fermente des PPC in der Hyaloplasmafraktion und die des Tricarbonsäurecyclus in den Mitochondrien lokalisiert sind, ist eine Reduktion von $NADP^+$ sowohl im Hyaloplasma als auch innerhalb der Mitochondrien möglich - auch ohne eine Verschiebung von Wasserstoff-Äquivalenten zwischen den Kompartments. Daneben ist zweifellos eine Bildung von NADPH + H^+ durch "Transhydrogenierung", d.h. durch enzymatischen Austausch von Wasserstoff von NADH + H^+ auf das NADP-System möglich. Bei der bedeutenden Stellung des NADPH + H^+ im intermediären Stoffwechsel läßt es sich leicht vorstellen, daß Schwankungen im Gehalt der Zellen an NAD bzw. NADP sowie im Verhältnis der oxydierten und reduzierten Anteile zueinander zu erheblichen Konsequenzen im intermediären Stoffwechsel führen können. Solche Schwankungen des NAD- bzw. NADP-Gehaltes der Zellen sind - mindestens unter pathologischen Bedingungen - bekannt. So ist z.B. bei experimenteller Schädigung des Organismus eine deutliche Verminderung des Gesamtbestandes der Diphosphopyridin-Nucleotide gemessen worden. In der Literatur sind bisher eine Reihe von Arbeiten erschienen, in denen Messungen des NADP-Gehaltes verschiedener Gewebe - ganz besonders aber in der Leber - veröffentlicht wurden. In Tab. 5 und 6 sind eine größere Zahl der in der Literatur wiedergegebenen Ergebnisse zusammengestellt und auf vergleichbare Angaben umgerechnet worden. Man kann erkennen, daß die in verschiedenen Laboratorien - teils

mit recht verschiedener Methodik - gewonnenen Ergebnisse erheblich voneinander abweichen. In einem Fall gelang es, nachzuweisen, daß die Ursache für die dort angegebenen außergewöhnlich hohen $NADP^+$-Werte durch eine spezielle Art der Aufbereitung des Gewebes erklärt werden kann (NEUBERT et al., 20). Die meisten der bisherigen Arbeiten geben lediglich über den Gesamtbestand der Zelle an NADP Auskunft. Eventuelle Änderungen des Redox-Zustandes werden daher natürlich nicht erfaßt.

Ferner kann man aus solchen Werten keine Anhaltspunkte darüber erhalten, wie sich die Pyridin-Nucleotide auf die beiden großen "Kompartments" - mitochondrialer und extramitochondrialer Raum - verteilen. Es ist jedoch von großem Interesse zu erfahren, ob z.B. unter pathologischen Bedingungen möglicherweise in einem intrazellulären Raum die NADP-Konzentration ansteigt und in dem anderen entsprechend absinkt - oder, ob sie sich z.B. gleichsinnig verhalten. Es war die Aufgabe dieser Arbeit, den NADP-Gehalt - und zwar sowohl $NADP^+$ als auch $NADPH + H^+$ - in den zwei interessanten intrazellulären Räumen - mitochondrialer und extramitochondrialer Raum - unter normalen und unter einigen pathologischen Bedingungen zu untersuchen. In ähnlichen Experimenten hat HOEHNE (36) vor einigen Jahren Veränderungen des NAD-Gehaltes untersucht, so daß ein Vergleich der Verhaltensweise der beiden Pyridin-Nucleotide möglich ist. Zur Ermittlung des NADP-

Gehaltes der Leber unter normalen und pathologischen bedingungen habe ich drei Aufbereitungsmethoden benutzt. Es sind dies:

1. Die "Gefrierstop"-Methode
2. Die Aufbereitung des Homogenates
3. Die Zellfraktionierung

B. Methodik

I. Zellfraktionierung

Die Methode der Zellfraktionierung beruht auf den grundlegenden Arbeiten von HOGEBOOM (7) und SCHNEIDER (22) aus den Jahren 1946-1954 und der entsprechenden Weiterentwicklung durch diese und andere Untersucher. Ein Teil der 1954 erhaltenen Ergebnisse ist in dem Artikel "Fractionation of Cell-Compartments of Animal Tissues - General Method for the Isolation of Liver Cell-Compartments" in Band I der Method in Enzymology niedergelegt (11). Diese Art der Aufbereitung von Geweben hat bisher große Anwendung gefunden; teils wurden sie ganz übernommen, teils leicht variiert (MYERS et al., 19; HOLTON et al., 12; WERKHEISER et al., 8; BIRT, BARTLEY, 3). Zur Zellfraktionierung wurde bei allen in dieser Arbeit erwähnten Versuchen folgendermaßen vorgegangen: Als Versuchstiere dienten Sprague-Dawley- oder Wistar-Ratten, die mit einem Standard-Futter (Altromin-R) und Wasser ad libitum ernährt wurden. Nach dem Dekapitieren und anschließendem Ausbluten der

Versuchstiere wurden die Lebern schnell herauspräpariert, um in einem Potter-Elvehjem-Plexiglas-Homogenisator in einer 0,25 M Saccharose-Lösung mit Zusatz von Tris (20 mM EDTA* 0,5 mM), auf dessen Bedeutung bereits MYERS et al. (19) und KAUFMANN et al. (14) hingewiesen haben, und NA**(10 mM) - BIRT and BARTLEY (2) - bei einem pH von 7.4 zerkleinert zu werden. Es wurde bei den Manipulationen streng darauf geachtet, daß sie bei einer niedrigen Temperatur (2 bis 4° C) erfolgten.
Mittels Differentialzentrifugation wurden die beiden Fraktionen Mitochondrien und "supernatant" (Mikrosomen und Hyaloplasma) in dem oben angegebenen Fraktionsmedium isoliert. Dabei wurde die Phywe-Kühlzentrifuge "Eispirouette" benutzt. Im ersten Arbeitsgang erfolgte bei 1.000 x g, (10 min.) die Abtrennung der "Zellkern-Fraktion", und man erhielt in den Zentrifugenröhrchen einen Überstand, der weitgehend von Bindegewebe, intakten Leberzellen, von Blutzellen und von eventuell agglutinierten Mikrosomen und Mitochondrien befreit war.

Nach Umgießen dieses Überstandes in andere ebenfalls vorgekühlte Zentrifugenröhrchen wurden nun im zweiten Arbeitsgang bei 9.000 x g (10 min.) die beiden gewünschten Fraktionen - Mitochondrien jetzt als Bodensatz und Hyaloplasma und Mikrosomen ("supernatant") im Überstand gewonnen. Nach Abgießen des "supernatant" wurden die Mitochondrien

---

*) Äthylendiamin-Tetraacetat

**) Nicotinamid

mit kalter Saccharose-Lösung aufgenommen und noch einmal hochtourig zentrifugiert, um noch die letzten verunreinigenden Zellkerne und Zellbruchstücke aus den Mitochondrien zu befreien ("Waschen").

Eine gelegentliche Kontrolle der Mitochondrien mit Hilfe eines Phasen-Kontrast-Mikroskopes und auch elektronenmikroskopisch - freundlicherweise für mich in der Forschungsstelle für Elektronenmikroskopie der FU von Herrn P.D. Dr. Merker ausgeführt - ergab eine ausreichende Reinheit der Präparationen.

Bezugswert für fast alle gemessenen NADP-Werte ist der Protein-Gehalt der entsprechenden Fraktion.

II. Proteinbestimmung

Zur Protein-Bestimmung, die aus diesem Grunde nach jedem Versuch vorgenommen werden mußte, wurde die Biurett-Methode verwendet. Diese Reaktion besteht darin, daß im alkalischen Milieu Paptide und Eiweißkörper mit Kupfersalzen rotviolette bis rote Komplexverbindungen bilden, die schließlich photometrisch bestimmt werden können. Jeweils ein Milliliter der auf ihren Protein-Gehalt zu untersuchenden Mitochondrien bzw. Plasmasuspensionen wurde in 10 ml einer 10%igen Natron-Lauge gelöst. Dieses Verfahren hat sich in zweierlei Hinsicht als sehr günstig erwiesen. Einmal konnte die Protein-Lösung so für einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden, und zum anderen

war die Lösung nach 1 bis 2 Tagen Stehenlassens weitgehend homogen und somit zur Protein-Bestimmung wesentlich geeigneter als frische Mitochondrien-Suspensionen, bei denen es leicht zu Verklumpungen kommen kann.
Als Bezugswert wurde eine definierte Serum-Albumin-Lösung herangezogen und der Ansatz selbst durch einen Leerwert, in dem nur die Extinktion der Reagentien gemessen wird, und einen Trübungswert (Extinktion der Protein-Suspension) korrigiert.

III. Extraktionsverfahren der Triphosphopyridinnucleotide

1) Allgemeines

Der Befund, daß von Pyridinnucleotiden der reduzierte Anteil durch Säuren zerstört wird, ohne den oxydierten Teil zu beeinträchtigen, und umgekehrt der oxydierte Teil im alkalischen Milieu einer Zerstörung anheimfällt und hier die reduzierte Form erhalten bleibt, bildet das Prinzip aller Extraktionsversuche in den bisher veröffentlichten Arbeiten, wenn auch das Gesamtverfahren von Autor zu Autor unterschiedliche Abwandlungen erfahren hat (GLOCK, MC LEAN; 26). Dieses Verhalten der Pyridinnucleotide ist bereits aus den dreißiger Jahren von EULER et al. (51, 33), FISCHER et al. (48), WARBURG, O., et al. (50, 53), MYRBÄCK et al. (52), ADLER (54) und JEDEIKIN (31) bekannt. In den Ansätzen der eigenen Versuche wurde das NADP in Anlehnung an die von KLINGENBERG (32)

angegebene Methode bestimmt. Alle Ansätze wurden genau den gleichen Bedingungen unterworfen (Temp., Zeit, usw.).

2) Extratkionsverfahren bei der "Aufarbeitung des Homogenates" und der "Zellfraktionierung"

Für die beiden Fraktionen Mitochondrien und Plasma einerseits und bei der "Aufarbeitung des Homogenates" ergab sich zur Extraktion des oxydierten Anteils folgende Manipulation:
Fünf Milliliter der Zellfraktion oder des Homogenates wurden in ein durch Eis gekühltes kleines Zylinderglas pipettiert und mittels Magnetrührer gut durchmischt. Zu dem stets gut gekühlten Extrakt wurden langsam 1 ml 1 N $HClO_4$ zur Proteinfällung zugeführt.
Nach Zentrifugation dieser Lösung in einer Spinco-Ultrazentrifuge (40 000 rpm, 15 min.) wurden 5 ml des Überstandes abpipettiert und mit einem ml 1M K_2HPO_4 und 0,6 ml 1N KOH neutralisiert. In dieser Lösung wurden die Pyridinnucleotide nun nach der enzymatisch-optischen Methode (WARBURG, 1936; 49) gemessen. Als Meßansatz fand der von HOHORST (13) angegebene Verwendung.
Zur Bestimmung des NADPH + H^+ wurde wie folgt verfahren:
3 ml der ebenfalls eisgekühlten Mitochondrien- oder Plasmafraktion wurden mit 1,3 ml 2,5 N NaOH (in der 200 ml Glutathion gelöst waren) versetzt.
Zur Proteinfällung wurden 1,5 ml absoluter Äthylalkohol und 2 ml 1M Tris-HCl, pH 7,5 zugesetzt. Die Neutralisation erfolgte

durch tropfenweise Zugabe von 2,3 - 2,4 ml einer 1 N HCl unter Eiskühlung und dauerndem Rühren mit einem Magnetrührer, um den lokalen pH-Abfall so gering wie möglich zu halten. Nach Zentrifugation mit der Spinco-Ultrazentrifuge (40.000 rpm, 15 min.) war die Lösung so weit von Protein befreit, daß auch hiermit die Messung am Spektrophotometer vorgenommen werden konnte.

3) Testansätze zur Verdeutlichung der Glutathionwirkung

Die relativ hohe Menge von Glutathion hat sich zum Schutze des reduzierten NADP vor enzymatischer oder nicht-enzymatischer Oxydation gut bewährt. Trotzdem ist auch beim Ansatz zur Bestimmung des reduzierten NADP nach oxydiertem NADP gesucht worden, das eventuell bei den einzelnen Manipulationen während des Aufbereitungsverfahrens nach der Neutralisation aus dem ursprünglichen $NADPH_2$ entstanden sein könnte und den wahren $NADPH_2$ - Wert gerade um diesen Betrag vermindern würde. Dieser vor Oxydation schützende Effekt von Glutathion (GSH) ließ sich anhand von zwei Testansätzen sehr gut verdeutlichen. Einer der beiden Ansätze lief als Vergleichsansatz, bei dem die als optimal ermittelte Menge Glutathion (200 mg) fortgelassen wurde. Bei dem Mitochondrien-Ansatz mit Glutathion wurden vier mμmole $NADPH_2$/mg Protein ermittelt, aber kein oxydierter Anteil. Ganz anders liegen die Verhältnisse im Parallelversuch ohne Glutathion-Zusatz.

Mit Glutathion:

$NADP^+$ 0,0

$NADPH_2$ 4,0

= 4,0 mμmole /mg Protein

ohne Glutathion:

$NADP^+$ 3,5

$NADPH_2$ 0,7

= 4,2 mμmole /mg Protein

Die $NADPH_2$ - Bestimmung ergab hier lediglich 0,7 mμmole/ mg Protein, während bei der Suche nach oxydiertem NADP tatsächlich die volle Differenz von 3,3 mμmole /mg Protein gefunden werden konnte. Es besteht kein Zweifel daran, daß dieses $NADP^+$ in Wahrheit als echtes NADPH + H^+ in den Mitochondrien anzusehen ist. Bei der Bestimmung des $NADPH_2$ - Gehaltes im Homogenat läßt sich dieser Effekt ebenso darstellen. Die Verteilung von $NADP^+$ / $NADPH_2$ im alkalisierten Ansatz mit Glutathion (200 mg) ergibt:

$NADP^+$: 35,5

$NADPH_2$: 425,5

= 461,0 mμmole/g Leberfrischgewicht

Verglichen mit diesen Werten ergibt das Resultat aus dem Ansatz ohne Glutathion:

$NADP^+$: 175

$NADPH_2$: 285

= 460 mμmole/g Leberfrischgewicht.

4.) Extraktionsverfahren bei der "Gefrierstop-Methode"

Für die Gefrierstop-Methode wurde flüssiger Stickstoff verwendet, in welchem die nach Dekapitieren der Versuchstiere schnell herauspräparierten Lebern gesenkt wurden und bei einer Temperatur von -196°C in kürzester Zeit erstarrten. Von diesen Leberstückchen wurde auf einer Torsionswaage eine Menge von 1g genau abgewogen und in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Porzellanmörser unter ständigem, vorsichtigen Nachfüllen von Stickstoff mit einem Pistill pulverisiert. Sodann wurden 5 ml der Säure in dieses Medium pipettiert, die ebenfalls sofort erstarrten und gleichermaßen pulverisiert wurden. Durch anschließendes sorgfältiges Verrühren des Leber- und Säureschnees ist dafür Sorge getragen worden, daß beim anschließenden Auftauen die Mikrogewebestückchen sich sofort im sauren Milieu befanden. Kurz nach Erreichen der flüssigen Phase wurde die Suspension in der Spinco-Ultrazentrifuge (45.000 rpm., 20 min.) zentrifugiert und ein klarer Extrakt gewonnen, in dem nach der Neutralisation spektrophotometrisch das $NADP^+$ bestimmt wurde. Die Aufarbeitung zur $NADPH_2$ - Bestimmung ist auch bei der Gefrierstop-Methode wegen der schwierigeren Proteinfällung etwas komplizierter.

Ein Gramm im flüssigen Stickstoff gefrorene Leber wurde auch hier zu Schnee zerkleinert und in diesem Falle 3,3 ml einer 1 N NaOH - wieder unter strenger Bewahrung tiefer Temperaturen - hinzugefügt und ebenfalls zu Schnee zerstampft.

Die aufgetaute Lösung wurde wie vorher beschrieben in einem Zentrifugenröhrchen unter Kühlung und Rühren mittels Magnetrührer mit 1,5 ml absolutem Äthylalkohol und 2 ml einer 1 M Tris-HCl-Lösung (pH 7.2) versetzt. Unter ständigem Rühren wurden dann tropfenweise 2,8 ml einer 1 N HCl zugegeben, das so denaturierte Eiweiß wiederum in der Ultrazentrifuge (45.000 rpm, 20 min.) abgetrennt und die spektrophotometrische Messung durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche (Tab. 9 u. 10), bei denen NADP einmal im Homogenat und zum anderen nach der Gefrierstop-Methode bestimmt wurde, lassen sich unmittelbar miteinander vergleichen.

Der Vergleich ist deshalb interessant, weil ausgeschlossen werden sollte, daß die Zerstörung der Zellstruktur zu einer Verminderung des NADP - Gehaltes führt. Werden die Homogenate bei $+2^{o}C$ so lange stehen gelassen, wie der Aufarbeitungszeit der Zellfraktionen entspricht, bekommt man zudem einen Anhalt über die Veränderung des NADP-Gehaltes während der Zellfraktionierung.

5.) Prüfung der Anwendbarkeit des Extraktionsverfahrens durch Testansätze

Die geschilderte Aufarbeitung, mit der alle Versuchsreihen ausgeführt wurden, stellt das Ergebnis einer Reihe von Voruntersuchungen dar. Die Richtigkeit dieser Schlußfolgerungen und die Anwendbarkeit der Ansätze bei der Ermittlung der $NADP^{+}$- und $NADPH_2$ - Werte wurde durch Zugabe einer bekannten

Menge $NADP^+$ bzw. $NADPH_2$ zu Gewebeextrakten und Durchführen der gesamten Methode der Aufarbeitung geprüft. Beim oxydierten Anteil ohne $NADP^+$ - Zusatz wzrde eine Extinktionsdifferenz $\Delta E = 65$ gemessen. Dem Testansatz mit der Gesamtmenge von 8,05 ml wurden 0,3 ml frisch angesetzte $NADP^+$ - Lösung zugefügt. 0,1 ml dieser $NADP^+$ - Lösung ad 3,2 ml in der Meßküvette ergaben eine Extinktionsdifferenz von $\Delta E = 345$.

Bei 0,3 ad 8,05 ml dieser Lösung müßte dann theoretisch bei vollständigem Wiederfinden der zugesetzten $NADP^+$ - Menge und Addition des normalen $NADP^+$ - Spiegels eine Extinktionsdifferenz von $\Delta E = 485$ zu erwarten sein. In der Tat betrug die gemessene Extinktionsdifferenz $\Delta E = 490$. Somit konnte gesagt werden, daß der Ansatz zur NADP-Bestimmung geeignet war. Bei der $NADPH^+$ - Bestimmung ergab der Kontrollwert, d.h. ohne NADPH + H^+ - Zusatz $\Delta E = 80$.

Hinzugegeben wurden 0,1 ml einer $NADPH_2$ - Lösung, so daß die Summe 195 betragen mußte. Gemessen wurde $\Delta E = 200$, so daß auch bei dem Ansatz zur Bestimmung des NADPH + H^+ der theoretische Wert wiedergefunden wurde.

6.) Kritische Betrachtung zur Extraktion der Pyridinnucleotide in schwach saurem Milieu.

Als Versuche zur Festlegung der eigentlichen Versuchsbedingungen sind auch die Versuchsserien anzusehen, die

durch die veröffentlichten NADP - Werte von BURCH et al. (4) angeregt wurden. BURCH et al. haben nämlich - im Gegensatz zu allen anderen Autoren - die Extraktion des $NADP^+$ im schwach sauren Milieu vorgenommen und dabei ungewöhnlich hohe $NADP^+$ - Werte erhalten. Die in Tab. 1 angeführten Werte sind das Ergebnis eigener Untersuchungen unter Benutzung einer schwach sauren Extraktion. BURCH et al. machen für die hohen $NADP^+$ - Werte eine säurelabile Komponente verantwortlich, die durch die Verwendung von starker $HClO_4$ mit Sicherheit zerstört werden soll.

Nach unseren Untersuchungen kann jedoch mit Sicherheit gesagt werden, daß zum mindesten für einen Teil des als säurelabil deklarierten $NADP^+$ diese Begründung nicht zutrifft. So wurde in einer Untersuchung über die Stabilität von $NADPH_2$ in verschiedenem pH-Milieu festgestellt, daß bei einem pH von 2.3 selbst nach einer Zeit von 30 bis 60 sec. noch etwa 50% des ursprünglichen $NADPH_2$ unzerstört waren. Aus der Tabelle 2 geht hervor, daß bei pH 1.5 das $NADPH_2$ wesentlich schneller zerstört wird.

Die mit der schwach sauren Extraktion ermittelten Werte stimmen mit den Angaben von BURCH et al. gut überein. Offenbar kann in der relativ langen Zeit, die bis zur vollständigen Zerstörung des $NADPH_2$ vergeht, durchaus eine Oxydation zum $NADP^+$ erfolgen, und es werden dann überhöhte Werte für die oxydierte Form gemessen. Die Oxydation selbst ist offenbar ein komplexer Vorgang, an dem auch nicht-enzymatische Vorgänge beteiligt sind.

Nach eigenen Untersuchungen spielen wohl auch, wie die Werte aus Tabelle 3 zeigen, Hämochromogene eine Rolle. Danach

Tab. 1

$NADP^+$ - Gehalt in den Lebern von Kontrolltieren.

Die Werte sind in mμmole / mg Protein Zelle angegeben.

EXTRAKTION IN SCHWACH SAUREM MILIEU (0,02 N H_2SO_4)
NACH DER METHODE VON BURCH ET AL. (4)

VERSUCH	MITOCHONDRIEN	"SUPERNATANT"	M + "S"
1	1,110	1,040	2,150
2	0,740	0,860	1,600
3	0,790	0,850	1,640
$\bar{x}$	0,880	0,917	1,797
s	± 0,201	± 0,108	± 0,307
$s_{\bar{x}}$	± 0,116	± 0,062	± 0,177

Tab. 2

STABILITÄT DES $NADPH_2$ BEI VERSCHIEDENEN pH-WERTEN

(A) bei pH = 2,3

Z E I T (sec.)	% des A U S G A N G S W E R T E S
0	100,0
30	70,0
60	36,0
80	29,5
160	6,5
320	0,0

(B) bei pH = 1,5

Z E I T (sec.)	% des A U S G A N G S W E R T E S
0	100,0
10	39,5
20	20,0

Die entsprechenden Ansätze wurden für die angegebenen Zeiten bei pH 2,3 bzw. pH 1,5 gehalten, der pH-Wert durch schnelle Zugabe von NaOH auf pH 7,5 gebracht und der nicht zerstörte Anteil des $NADPH_2$ enzymatisch bestimmt.

wurde der NADP - Gehalt von Mitochondrien-Präparationen (gewonnen nach der vorn beschriebenen Methode) unter verschiedenen Bedingungen gemessen (Tab. 3 und 4). Der NADP - Gehalt der Erythrozyten ist zum Vergleich ebenfalls angegeben. Die Werte, die bei der schwach sauren Extraktion gefunden wurden, liegen deutlich über denen, die im stark sauren Extrakt gemessen wurden - was im Prinzip dem von BURCH et al. (4) entspricht.
Wir glauben nach den mitgeteilten Versuchen, daß der Wert im schwach sauren Extrakt wegen einer Oxydation des nicht zerstörten $NADPH_2$ zu hoch liegt. Der $NADP^+$ - Wert im dritten Ansatz, bei dem zu der Mitochondrien-Suspension noch eine definierte Erythrozyten-Menge gegeben wurde, war durch eine starke Erhöhung, wie sie durch den zusätzlichen $NADP^+$ - Gehalt der Erythrozyten nicht erklärt werden kann, charakterisiert. Diese Erhöhung war bezeichnenderweise bei der Schwach-Säure-Methode gegenüber der mit starker Säure wesentlich ausgeprägter.

Auch dieses Ergebnis stützt die Vermutung, daß eine durch Hämochromogene bewirkte Oxydation des noch nicht zerstörten Anteils von $NADPH + H^+$ stattfindet. Wie der vierte Ansatz zeigt, schützt reduziertes Glutathion das $NADPH + H^+$ bei der relativ großen Konzentration von Hämochromogenen nicht.

Vollkommen bestätigt wird die Annahme einer $NADPH + H^+$ - Oxydation unter den Bedingungen einer schwach sauren

Extraktion durch die Versuchsserie, bei der NADPH + H^+ dem Ansatz zugesetzt wurde. Ein erheblicher Teil dieses zugesetzten NADPH + H^+ konnte als $NADP^+$ wiedergefunden werden.

Tab. 3

	Säurestop	pH	$NADP^+$ mμ Mol/ml	NAD^+ mμ Mol/ml
Erythrozyten	H_2SO_4	2,3	3	3
Mitochondrien	H_2SO_4	2,3	13	33
	$HClO_4$	1,0	3	26
Mitoch.+Eryth.	H_2SO_4	2,3	24	43
	$HClO_4$	1,0	10	35
Mitoch.+Eryth.+GSH	H_2SO_4	2,3	24	32
Mitoch.+$NADPH_2$ (30 mμ Mol/ml)	H_2SO_4	2,3	19	-
Mitoch.+$NADH_2$	H_2SO_4	2,3	-	42
(75 mμ Mol/ml)	$HClO_4$	1,0	-	27
Mitoch.+Eryth.+$NADPH_2$	H_2SO_4	2,3	40	-
(30 mμ Mol/ml)	$HClO_4$	1,0	15	-
Mitoch.+Eryth.+$NADH_2$	H_2SO_4	2,3	-	56
(75 mμ Mol/ml)				

Die in Spalte zwei aufgeführten Werte sind von HOEHNE (Tab. 3) ermittelt worden und zeigen ein ähnliches Verhalten. Wenn den Mitochondrien Glutathion zugesetzt wird, wie es in Versuch Nr. 5 geschah, sinkt der $NADP^+$ - Gehalt von 10 mμmole/ml

auf 4 mμ mole/ml und zeigt selbst bei Zugabe von einer definierten Menge NADPH + H^+ zum Testansatz (Tab. 4) keinen höheren Wert als 5 mμ mole /ml. Man kommt damit dem Wert, wie er in der Stark-Säure-Methode ermittelt wurde, auffällig nahe. Es ist nach diesen Untersuchungen klar, daß nur die Extraktion im stark sauren Milieu richtige Werte für das $NADP^+$ ergibt.

Tab. 4

		pH	$NADP^+$ (mμ mole/ml)
Mitochondrien	H_2SO_4	2,3	10
	$HClO_4$	1,0	3
+ $NADP^+$ (20 mμ mole/ml)	H_2SO_4	2,3	30
	$HClO_4$	1,0	23
+$NADPH_2$ (20 mμ mole/ml)	H_2SO_4	2,3	18
	$HClO_4$	1,0	5
+ GSH	H_2SO_4	2,3	4
+$NADPH_2$ + GSH	H_2SO_4	2,3	5

C. Ergebnisse und Diskussion

I. NADP und NADPH + H^+ - Werte unter Normalbedingungen in der Summe der Zellfraktionen bei unterschiedlichen Nicotinamidkonzentrationen im Aufbereitungsmedium

Die Bestimmung der Triphosphopyridinnucleotide wurde in der Zellfraktionierungen a) Mitochondrien und b) "supernatant" (Hyaloplasma und Mikrosomen) vorgenommen. Jeder Wert der folgenden Tabellen entspricht einem Mittelwert aus drei Rattenlebern, die in 0,25 M Saccharoselösung (pH 7,4) homogenisiert wurden. Das Nicotinamid wurde in einer Konzentration von 0,01 M diesem Medium beigefügt, um Nucleosidasen zu hemmen (PURVIS; 21). Die Angabe der Werte erfolgte in allen Tabellen in µmol/mg Protein Zelle. Das bedeutet, daß bei einer Berechnung die Verteilung des Proteingehaltes auf die einzelnen Zellfraktionen berücksichtigt worden ist. Die Werte geben damit den Gehalt wieder, wie er in den Zellen angetroffen wird. Es wurde von folgender Verteilung ausgegangen, die für Lebergewebe recht gut belegt ist (27, 29).

Kerne	10 - 15%
Mitochondrien	25 - 30%
Mikrosomen + Hyaloplasma	58 - 64%
	= 100%

Mikrosomen und Hyaloplasma werden unter dem Begriff "supernatant" zusammengefaßt. Die nahezu gleichen

Relationen (1:1) des Proteingehaltes beider Anteile im "supernatant" konnte bei eigener Trennung durch Differentialzentrifugation bestätigt werden. Zum Vergleich der in eigenen Versuchen ermittelten Werte sind zwei Tabellen mit Angaben aus der Literatur zusammengestellt.

Tab. 5 gibt die Gesamtwerte für NAD^+ und $NADPH_2$ der Leber wieder, Tab. 6 Werte aus nur einem Zellkompartment, den Mitochondrien.

Tab. 5: $NADP^+$ + NADPH + H^+ - WERTE IN RATTENLEBERN
Zahlenzusammenstellung aus der Literatur
in mμ mole/g Leber (Frischgewicht)

		$NADP^+$	$NADPH+H^+$	$NADP^+$+NADPH+H^+
(26)	G.E.Glock u.P. McLean	8	275	281
(30)	Jacobson u.Kaplan	154	295	449
(17)	Lowry, Passouneau et al.	113	497	610
(1)	Bassham, Birt et al.	25	247	272
(2)	Birt u.Bartley	100	420	520
(28)	Holzer et al.	8	303	311
(25)	Glock u.McLean	33	308	341
(5)	Caiger, Morton et al.	28	375	403
(16)	Klingenberg Caiger (tabellar. W.)	113	315	428
(26)	Glock u.McLean	8	266	274
(5)	Jacobson u.Kaplan	44	425	469
(1)	Bassham	25	251	276
(5)	Lowry et al.	115	502	617
(5)	Caiger et al.	29	380	409
(9)	Desselberger	59	360	419
	eigene Ergebnisse	86	482	568

Tab. 6

$NADP^+ + NADPH + H^+$ - W E R T E I N R A T T E N L E B E R N

Zahlenzusammenstellung aus der Literatur

in µmole/g Protein

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"		
	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$
(47) Glock u. McLean	0,2	1,6	1,8			
(30) Jacobson u. Kaplan	0,4	3,9	4,4			
(32) Klingenberg u. Stenczka	0,2	3,2	3,4			
(3) Birt u. Bartley	1,9	1,6	3,5			
(21) Purvis	0,3	3,3	3,6			
(21) Purvis	0,2	2,3	2,5			
(23) Bonman	0,4	4,2	4,6			
(23) Winter	0,3	4,9	5,2			
(23) Bailie	0,2	5,0	5,2			
eigene Ergebnisse	0,4	3,7	4,1	0,5	2,2	2,7

Ein Gesamtprofil der beiden großen Zellfraktionen, 1.) Mitochondrien und 2.) "supernatant", das sich aus dem Hyaloplasma und den Mikrosomen zusammensetzt, wurde erstmals in dieser Arbeit aufgestellt. Verglichen mit bisher veröffentlichten Werten sind die Daten der

eigenen Versuche hoch. Das trifft auch für die Messung in den Mitochondrien zu.

Die Mittelwerte aus etwa 10 Bestimmungen unter Normal-Bedingungen sind in der Tabelle 7 wiedergegeben. Im Gegensatz zum NAD - das zum überwiegenden Anteil in der oxydierten Form vorliegt - liegen bei dem NADP die Werte für die reduzierte Form ($NADPH + H^+$) wesentlich über denen der oxydierten. Das gilt sowohl für Mitochondrien als auch für "supernatant". Isoliert für die Mitochondrien haben KLINGENBERG et al. (10) gleiche Beobachtungen gemacht. Die Tabelle 8 gibt Werte wieder, die unter Normal-Bedingungen gewonnen wurden, wenn nur 1 mM Nicotinamid dem Homogenisationsmedium zugesetzt wurde. Die Werte können sonst direkt mit denen der Tab. 7 verglichen werden. Die Anregung zu diesem Vergleich mit verschiedenen Nicotinamid-Konzentrationen stammt von den Ergebnissen von HOEHNE (36). Beim NAD konnte HOEHNE nämlich erhebliche Unterschiede finden, wenn statt 10 mM Nicotinamid nur 1 mM Nicotinamid benutzt wurde. Im Falle der Bestimmung von oxydiertem und reduziertem NADP konnten solche Unterschiede in den eigenen Versuchen nicht gefunden werden.

Die Werte der beiden Versuchsreihen, hier als Mittelwerte angegeben, decken sich nahezu vollständig. Das betrifft auch die Relation $NADP^+ / NADPH_2$ in den einzelnen Zellfraktionen. Bei allen weiteren Versuchen ist trotzdem eine Nicotinamid-Konzentration von 10^{-2} M gewählt worden.

Tab. 7

NADP - N O R M A L W E R T E in Mitochondrien und "supernatant"von Rattenlebern

Versuch Nr.	MITOCHONDRIEN $NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	"SUPERNATANT" $NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	MITOCH.+"SUPERNAT." $NADP^+$ (M + S)	$NADPH_2$ (M + S)	$NADP^+ + NADPH_2$ (M+S)
1	0,120	1,110	1,230	0,390	1,250	1,640	0,510	2,360	2,870
2	0,130	0,970	1,100	0,360	1,120	1,480	0,490	2,090	2,580
3	0,110	1,060	1,170	0,190	1,370	1,560	0,300	2,430	2,730
4	0,090	1,360	1,450	0,230	1,330	1,560	0,320	2,690	3,010
5	0,140	1,120	1,260	0,340	1,690	2,030	0,480	2,810	3,290
6	0,090	1,030	1,120	0,350	1,510	1,860	0,440	2,540	2,980
7	0,100	1,090	1,190	0,330	0,880	1,210	0,430	1,970	2,400
8	0,080	1,130	1,210	0,380	1,170	1,550	0,460	2,300	2,760
9	0,110	1,000	1,110	0,330	1,240	1,570	0,440	2,240	2,680
10	0,110	1,300	1,410	0,290	1,380	1,670	0,400	2,680	3,080
$\bar{x}$	0,108	1,117	1,225	0,319	1,294	1,613	0,427	2,411	2,838
s	±0,020	±0,125	±0,120	±0,065	±0,221	±0,219	±0,069	±0,272	±0,261
$s_{\bar{x}}$	±0,006	±o,o39	±0,038	±0,020	±0,070	±0,069	±0,022	±0,086	±0,083

Jeder Wert entspricht einem Mittel aus drei Rattenlebern-homogenisiert in 0,25M Saccharoselösung(pH 7,4) und einer Nicotinamidkonzentration von 10^{-2}M zur Hemmung von Nucleosidasen.

Die Werte sind in mμ mole/mg Prot. Zelle angegeben.

In dieser und allen nun folgenden Tabellen ist jeweils $\bar{x}$,±s und± $s_{\bar{x}}$ errechnet.

$\bar{x}$ = Mittelwert
s = Standardabweichung
$s_{\bar{x}}$ = Mittlerer Fehler des Mittelwertes

Tab. 8

NADP - N O R M A L W E R T E in Mitochondrien und "Supernatant" von Rattenlebern

Versuch Nr.	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCH.+"SUPERNAT."		
	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$(M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)
1	0,120	1,220	1,340	0,350	1,170	1,520	0,470	2,390	2,860
2	0,100	1,120	1,220	0,440	1,370	1,810	0,540	2,490	3,030
3	0,160	1,000	1,160	0,290	1,090	1,380	0,450	2,090	2,540
4	0,100	1,060	1,160	0,360	1,500	1,860	0,460	2,560	3,020
5	0,080	1,090	1,170	0,400	1,530	1,930	0,480	2,620	3,100
6	0,090	1,420	1,510	0,410	1,240	1,650	0,500	2,660	3,160
7	0,110	1,110	1,220	0,360	1,560	1,920	0,480	2,670	3,140
8	0,120	0,980	1,100	0,230	0,990	1,220	0,350	1,970	2,320
9	0,100	1,020	1,120	0,210	0,980	1,190	0,310	2,000	2,310
10	0,100	0,959	1,050	0,310	1,310	1,620	0,410	2,260	2,670
$\bar{x}$	0,108	1,097	1,205	0,336	1,274	1,610	0,445	2,371	2,815
s	±0,022	±0,138	±0,133	±0,076	±0,217	±0,277	±0,070	±0,274	±0,332
$s_{\bar{x}}$	±0,007	±0,044	±0,042	±0,024	±0,068	±0,088	±0,022	±0,087	±0,105

Jeder Wert entspricht einem Mittel aus drei Rattenlebern - homogenisiert in 0,25M Saccharoselösung (pH 7,4) und einer Nicotinamidkonzentration von 10^{-3} M.
Die Werte sind in mμ mole/mg Prot. Zelle angegeben.

II. Vergleichende Bestimmung des NADP-Gehaltes im Lebergewebe

1) Werte nach der Gefrierstop-Methode

Die nach der Gefrierstop-Methode ermittelten Werte sind in Tab. 9 zusammengestellt. Sie sind angegeben in µMole/g Leberfrischgewicht und sind somit mit den Zahlen der in Tab. 4 angegebenen NADP-Werte aus dem Gesamthomogenat direkt vergleichbar. Die Tatsache, daß ein Wert beim Gesamthomogenat eigentlich ein Mittel aus drei Rattenlebern darstellt, dagegen aber bei der Gefrierstop-Methode nur einen Bruchteil einer Leber eines einzelnen Versuchstieres zur Verwendung kommt, könnte bei einem Vergleich beider Tabellen miteinander eine gewisse Rolle spielen. Unter (N) sind die Normalwerte mit ihren Mittelwerten angegeben.

2) Werte im Homogenat

Die Tab. 10 zeigt die $NADP^+$+ $NADPH+H^+$ - Werte im Gesamthomogenat unbehandelter Tiere. Die Angabe der Werte erfolgte in µmole/g Leberfrischgewicht und kann nach Umrechnung auf mµ mole/mg Protein direkt mit den Werten aus Tab. 7 verglichen werden. Bei der Umrechnung von µmol/g Leberfrischgewicht auf mµ mole/mg Protein konnte von dem Befund ausgegangen werden, daß die Leberzelle 70% aus Wasser (ANFINSEN; 24, und BORST; 23) und nur zu 30% aus Trockensubstanz besteht. Der Proteingehalt der Trockensubstanz

wird mit 66% angegeben (BIRT u. BARTLEY; 3), was auf Leberfrischgewicht bezogen bedeutet, daß nur 20% der frischen Leber aus Protein besteht. Bei allen Umrechnungen in dieser Arbeit von Feuchtgewicht auf mg Protein wurde daher ein Faktor von 5,0 benutzt. Auch die Redoxverhältnisse von $NADP^+$ zu $NADPH_2$ = 0,176 entsprechen etwa den Werten, wie sie nach der Gefrierstop-Methode gewonnen wurden ($NADP^+$/ $NADPH_2$ = 0,279; Tab. 9) und sehr genau denen der Summe der Zellfraktionen ($NADP^+$/ $NADPH_2$ = 0,179; Tab. 7).

Mit einer völlig anderen Extraktionsmethode (NEUHOFF, 1965; 37) haben inzwischen NEUHOFF und DESSELBERGER (38) Pyridinnucleotidwerte für die Gesamtleber publiziert.
Mit einem konstant gehaltenen pH von 7,2 lassen sich mit dieser Methode die oxydierten und reduzierten Pyridinnucleotide gleichzeitig extrahieren. Das Extraktionsmedium ist phenolgesättigt und gestattet so eine nahezu quantitative Denaturierung von Eiweiß. Durch anschließendes wiederholtes Ausschütteln mit einem mehrfachen Volumen an Chloroform läßt sich die Phenolkonzentration so weit erniedrigen, daß einer spektrofluorometrischen oder enzymatisch-optischen Bestimmung der Pyridinnucleotide nichts mehr im Wege steht.
Die mit dieser Methode ermittelten Werte der oxydierten und reduzierten Pyridinnucleotide lassen sich mit den in dieser Arbeit dargelegten Zahlen sowohl in der Summe (Tab. 5) als auch im Redoxverhältnis ($NADP^+$ / $NADPH_2$ = 0,164) gut vergleichen. Es werden aber keine besseren Werte als mit der in dieser Arbeit angewandten Methode erzielt.

Tab. 9

$NADP^+ + NADPH+H^+$ - WERTE DER LEBER - GEFRIERSTOP-METHODE

(N) = Normalwerte

(6-AN) = NADP-Gehalt der Leber, 15 Stunden nach Applikation von 100 mg/kg 6-AN i.p.

(N)	$NADPH+H^+$	$NADP^+$	$NADP^+ + NADPH+H^+$
	0,430	0,093	0,523
	0,390	0,115	0,505
	0,410	0,093	0,503
	0,330	0,115	0,445
	0,410	0,115	0,525
	0,360	0,103	0,463
	0,350	0,103	0,453
	0,410	0,115	0,525
	0,425	0,093	0,518
	0,350	0,103	0,453
	0,330	0,103	0,433
	0,370	0,115	0,485
$\bar{x}$ =	0,3804	0,1060	0,4864
s =	±0,036	±0,009	±0,035
$s_{\bar{x}}$ =	±0,010	±0,003	±0,010

(6-AN)	$NADPH+H^+$	$NADP^+$	$NADP^+ + NADPH+H^+$
	0,275	0,103	0,378
	0,240	0,090	0,330
	0,260	0,077	0,337
	0,250	0,096	0,346
	0,240	0,064	0,304
	0,240	0,096	0,336
	0,315	0,096	0,411
	0,285	0,103	0,388
	0,330	0,096	0,426
	0,250	0,077	0,327
$\bar{x}$ =	0,2685	0,0898	0,3583
s =	±0,032	±0,013	±0,040
$s_{\bar{x}}$ =	±0,010	± 0,004	± 0,013

Tab. 10

NADP - WERTE AUS LEBERGESAMTHOMOGENAT

Die Werte sind in µmolen/g Leber-Frischgewicht angegeben. Die Höhe der Nicotinamidkonzentration im Aufbereitungsmedium betrug 10^{-2} M.

(A) Normalwerte (unbehandelte Tiere)

(B) NADP - Werte aus Lebergesamthomogenat 12 Stunden nach Applikation von 500 mg/kg NA i.p. (Zeitpunkt des maximalen Anstieges)

(A)	$NADPH+H^+$	$NADP^+$	$NADP^+ + NADPH+H^+$
	0,445	0,085	0,530
	0,460	0,073	0,533
	0,475	0,080	0,555
	0,425	0,090	0,515
	0,450	0,075	0,525
	0,480	0,065	0,545
	0,475	0,070	0,545
	0,390	0,095	0,485
$\bar{x}$	0,450	0,079	0,529
s	±0,030	±0,010	±0,022
$s_{\bar{x}}$	±0,011	±0,004	±0,008
	oder in mµ molen/mg Protein		
	2,2500	o,3955	2,6455

(B)	$NADPH+H^+$	$NADP^+$	$NADP^+ + NADPH+H^+$
	0,865	0,105	0,970
	0,880	0,140	1,020
$\bar{x}$	0,8725	0,1225	0,9950
	oder in mµ molen/mg Protein		
	4,3625	0,6125	4,9750

III. Untersuchung des NADP-Gehaltes der Leber unter pathologischen Bedingungen und unter dem Einfluß einiger Pharmaka

1) Einfluß von Nicotinamid-Gabe in vivo auf den NADP-Gehalt der Leber

a) NADP-Gehalt nach einmaliger Gabe von Nicotinamid

Es wurde der Einfluß von Nicotinamid auf die Triphospho-pyridinnucleotide in Mitochondrien und "supernatant" nach einmaliger Applikation von 500 mg/kg i.p. verfolgt. Dabei wurden Messungen nach 6, 12, 14,5, 24 und 48 Stunden vorgenommen. Werden die Mittelwerte graphisch aufgetragen, so läßt sich sehr eindrucksvoll ein "peak" bei 12 Std. erkennen (Tab. 12). Danach streben sämtliche Werte der einzelnen Kompartments wieder den Normalwerten zu, ähnlich wie es für die NAD-Werte (GREENGARD, 15; HOEHNE, 36) zutrifft.

Der Befund, daß es nach Applikation von 500 mg/kg Nicotinamid zu einem deutlichen Anstieg von NAD kommt (HOEHNE; 36), kann - wenn auch nur in sehr viel geringerem Maße - im Falle des NADP bestätigt werden. Ganz im Gegensatz zum NAD, bei dem es zu einer fast selektiven Erhöhung der oxydierten Form kommt, ist es im Falle des NADP hauptsächlich die reduzierte Form, die einen Anstieg erfährt (Tab. 11, 12, 13, 14, 15). Sie erreicht bei weitem nicht das Ausmaß, wie die ebenfalls bei 12 Std. post injectionem von 500 mg/kg NA ein Maximum erreichende

oxydierte Form des NAD (HOEHNE; 36). Auch ist ein so unterschiedliches Verhalten der oxydierten und reduzierten NAD-Werte innerhalb der beiden Kompartments nicht zu beobachten.

Die $NADPH_2$-Werte steigen sowohl in den Mitochondrien als auch im "supernatant" prozentual etwas stärker an als die der oxydierten Form. Die Summe aller NADP-Werte ergibt zum Zeitpunkt des maximalen Anstieges mit 5,06 mμ mole/mg Protein Zelle annähernd eine Verdoppelung. Verglichen mit der vielfachen Erhöhung des NAD-Wertes (HOEHNE; 36), reagiert das NADP unter gleichen Bedingungen also viel geringer.

Tab. 11

N A D P - W E R T E NACH EINMALIGER GABE VON NICOTINAMID

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
6	0,110	1,300	1,410	0,440	1,590	2,030	0,550	2,890	3,440	
	0,140	1,260	1,400	0,420	2,340	2,760	0,560	3,600	4,160	
	0,120	1,050	1,170	0,560	1,460	2,020	0,680	2,510	3,190	
	0,100	1,320	1,420	0,460	1,890	2,350	0,560	3,210	3,770	
	0,120	1,380	1,500	0,550	1,430	1,980	0,670	2,810	3,480	
	0,130	1,470	1,600	0,490	1,630	2,120	0,620	3,100	3,720	
$\bar{x}$	0,120	1,297	1,416	0,487	1,723	2,210	0,607	3,020	3,627	
s	±0,014	±0,141	±0,143	±0,058	±0,344	±0,301	±0,059	±0,374	±0,335	
$s_{\bar{x}}$	±0,006	±0,058	±0,058	±0,024	±0,140	±0,123	±0,024	±0,153	±0,137	

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern nach einmaliger Applikation von Nicotinamid(500 mg/kg i.p.).Die angegebenen Werte verstehen sich in mμ mole/mg Prot.Zelle.
Zeitpunkt: 6 Stunden nach der Applikation.

Abb. 1 zeigt die graphische Darstellung dieser Versuchsergebnisse.

Tab. 12

N A D P - W E R T E NACH EINMALIGER GABE VON NICOTINAMID

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
12	0,110	1,850	1,960	0,550	2,150	2,700	0,660	4,000	4,660	
	0,090	1,920	2,010	0,720	2,570	3,290	0,810	4,490	5,300	
	0,140	1,930	2,070	0,520	2,340	2,860	0,660	4,270	4,930	
	0,180	1,690	1,870	0,550	2,860	3,410	0,730	4,550	5,280	
	0,110	1,730	1,840	0,650	2,080	2,730	0,770	3,810	4,570	
	0,190	1,870	2,060	0,750	2,830	3,580	0,940	4,700	5,640	
$\bar{x}$	0,137	1,832	1,968	0,623	2,472	3,095	0,762	4,303	5,063	
s	±0,041	±0,100	±0,097	±0,098	±0,336	±0,379	±0,106	±0,343	±0,415	
$s_{\bar{x}}$	±0,017	±0,041	±0,039	±0,040	±0,137	±0,155	±0,043	±0,140	±0,169	

NADP-Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern nach einmaliger Applikation von Nicotinamid(500 mg/kg i.p.).Die angegebenen Werte verstehen sich in mµ mole/mg Prot.Zelle.
Zeitpunkt: 12 Stunden nach der Applikation.

Tab. 13

N A D P - W E R T E NACH EINMALIGER GABE VON NICOTINAMID

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
14,5	0,120	1,540	1,660	0,620	1,820	2,440	0,740	3,360	4,100	
	0,070	1,340	1,910	0,480	2,340	2,820	0,550	4,180	4,730	
	0,100	1,460	1,560	0,510	2,020	2,530	0,610	3,480	4,090	
	0,090	1,530	1,620	0,470	2,110	2,580	0,560	3,640	4,200	
	0,130	1,690	1,820	0,590	1,920	2,510	0,720	3,610	4,330	
	0,060	1,710	1,790	0,460	2,050	2,510	0,540	3,760	4,300	
$\bar{x}$	0,098	1,528	1,727	0,522	2,043	2,565	0,620	3,672	4,292	
s	±0,023	±0,142	±0,134	±0,068	±0,178	±0,133	±0,089	±0,285	±0,237	
$s_{\bar{x}}$	±0,009	±0,058	±0,055	±0,023	±0,073	±0,054	±0,036	±0,116	±0,097	

NADP-Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern nach einmaliger Applikation von Nicotinamid(500 mg/kg i.p.).Die angegebenen Werte verstehen sich in mμ mole/mg Prot.Zelle-
Zeitpunkt: 14,5 Stunden nach der Applikation.

Tab. 14

N A D P - W E R T E NACH EINMALIGER GABE VON NICOTINAMID

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
24	0,080	1,390	1,470	0,460	1,690	2,150	0,540	3,080	3,620	
	0,100	1,350	1,450	0,290	1,170	1,460	0,390	2,520	2,910	
	0,120	1,230	1,350	0,320	1,270	1,590	0,440	2,500	2,940	
	0,090	1,320	1,410	0,360	1,630	1,990	0,450	2,950	3,400	
	0,120	1,310	1,430	0,390	1,500	1,890	0,510	2,810	3,320	
	0,110	1,130	1,240	0,330	1,300	1,630	0,440	2,430	2,870	
$\bar{x}$	0,103	1,288	1,392	0,358	1,427	1,785	0,462	2,715	3,177	
s	±0,016	±0,094	±0,085	±0,061	±0,211	±0,266	±0,054	±0,269	±0,313	
$s_{\bar{x}}$	±0,007	±0,038	±0,035	±0,025	±0,086	±0,109	±0,022	±0,110	±0,128	

NADP-Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern nach einmaliger Applikation von Nicotinamid(500 mg/kg i.p.).Die angegebenen Werte verstehen sich in mμ mole/mg Prot. Zelle. Zeitpunkt: 24 Stunden nach der Applikation.

Tab. 15

N A D P - W E R T E NACH EINMALIGER GABE VON NICOTINAMID

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
48	0,090	1,150	1,240	0,340	1,300	1,640	0,430	2,450	2,880	
	0,110	1,050	1,160	0,210	1,240	1,450	0,320	2,290	2,610	
	0,090	1,110	1,200	0,290	1,110	1,400	0,380	2,220	2,600	
	0,100	1,120	1,220	0,230	1,200	1,430	0,330	2,320	2,650	
	0,150	1,010	1,160	0,210	1,330	1,540	0,360	2,340	2,700	
	0,110	1,070	1,180	0,280	1,040	1,320	0,390	2,110	2,500	
$\bar{x}$	0,108	1,085	1,193	0,260	1,203	1,463	0,368	2,288	2,657	
s	±0,022	±0,051	±0,033	±0,052	±0,112	±0,112	±0,041	±0,115	±0,128	
$s_{\bar{x}}$	±0,009	±0,021	±0,013	±0,021	±0,046	±0,046	±0,017	±0,047	±0,052	

NADP-Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern nach einmaliger Applikation von Nicotinamid(500 mg/kg i.p.).Die angegebenen Werte verstehen sich in mμ mole/mg Prot. Zelle. Zeitpunkt: 48 Stunden nach der Applikation.

b) NADP-Gehalt nach mehrfacher Gabe von Nicotinamid

Die Reaktion der Triphosphopyridinnucleotide in vivo sowohl in Mitochondrien als auch im "supernatant" wurde auch nach mehrfacher Gabe von 500 mg/kg NA i.p. geprüft. Die Werte sind in Tab. 16 bis 18 aufgeführt und in mμ mole/mg Protein Zelle angegeben. Sie können direkt mit den Werten nach einmaliger Applikation verglichen werden. Die graphische Darstellung der Mittelwerte (Abb. 2) ausgehend von den Normalwerten verdeutlicht das Verhalten unter diesen Bedingungen. Nach jeweils 12 Std., dem Zeitpunkt des maximalen Anstieges, wurde eine erneute Applikation der bereits o.a. Nicotinamidmenge vorgenommen und Messungen 12, 14 und 28 Stunden nach der erstmaligen Gabe von NA durchgeführt. Die graphische Darstellung läßt erkennen, daß trotz mehrfacher Applikation hoher Dosen der maximale Anstieg der NADP-Werte ebenfalls nach 12 Std. erfolgte. Darüber hinaus führen weiter zugeführte Nicotinamid-Dosen zu keiner weiteren Erhöhung der NADP-Werte. Es kommt vielmehr zu einem stetigen Abfall nach dem Maximum bei 12 Std. Der Abfall geht allerdings etwas langsamer vonstatten als bei einmaliger Gabe von Nicotinamid, fast in Form einer nur langsam dem Nullwert zustrebenden Geraden.
Die Feststellung, daß trotz wiederholter Applikation so hoher Dosen von Nicotinamid sich keine Erhöhung des NADP-Spiegels erzwingen ließ, konnte HOEHNE (36) unter gleichen Bedingungen auch für das NAD machen. Es kommt

Tab. 16

N A D P - W E R T E NACH NICOTINAMID - APPLIKATION IM INTERVALL VON 12 STUNDEN.

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
12	0,090	1,920	2,010	0,310	2,350	3,370	0,900	4,780	5,680	
	0,140	1,320	1,950	0,350	2,540	3,190	0,790	4,360	5,150	
	0,130	1,700	1,330	0,520	2,340	2,360	0,700	4,040	4,740	
	0,160	1,850	2,010	0,590	2,750	3,350	0,750	4,610	5,360	
	0,110	1,760	1,370	0,490	2,440	2,930	0,600	4,200	4,800	
$\bar{x}$	0,136	1,810	1,945	0,612	2,583	3,200	0,748	4,393	5,146	
s	±0,037	±0,084	±0,063	±0,127	±0,218	±0,329	±0,111	±0,300	±0,392	
$s_{\bar{x}}$	±0,016	±0,038	±0,030	±0,057	±0,097	±0,147	±0,050	±0,134	±0,175	

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern nach Applikation(i.p.)von 500 mg/kg Nicotinamid im Intervall von 12 Stunden.Die Angabe der Werte erfolgte in mμ mole/mg Protein Zelle. Zeitpunkt: 12 Stunden nach der ersten Applikation.

Abb. 2 zeigt die graphische Darstellung dieser Versuchsergebnisse.

Tab. 17

N A D P - W E R T E NACH NICOTINAMID - APPLIKATION IM INTERVALL VON 12 STUNDEN.

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
24	0,080	1,670	1,750	0,460	2,440	2,900	0,540	4,110	4,650	
	0,080	1,620	1,700	0,440	1,950	2,030	0,520	3,570	4,090	
	0,120	1,590	1,710	0,470	2,080	2,550	0,590	3,670	4,260	
	0,080	1,580	1,660	0,390	2,670	3,060	0,470	4,250	4,720	
	0,070	1,690	1,760	0,520	2,050	2,570	0,590	3,740	4,330	
$\bar{x}$	0,086	1,630	1,716	0,456	2,238	2,622	0,542	3,868	4,410	
s	±0,020	±0,049	±0,040	±0,047	±0,304	±0,396	±0,051	±0,295	±0,267	
$s_{\bar{x}}$	±0,009	±0,022	±0,018	±0,021	±0,136	±0,177	±0,023	±0,132	±0,119	

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern nach Applikation(i.p.) von 500 mg/kg Nicotinamid im Intervall von 12 Stunden.Die Angabe der Werte erfolgte in mμ mole/mg Prot.Zelle.
Zeitpunkt: 24 Stunden nach der ersten Applikation.

Tab. 18

N A D P - W E R T E NACH NICOTINAMID - APPLIKATION IM INTERVALL VON 12 STUNDEN

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"		
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)
48	0,060	1,150	1,210	0,380	1,790	2,170	0,440	2,940	3,380
	0,130	1,010	1,140	0,380	1,370	1,750	0,510	2,380	2,890
	0,080	1,110	1,190	0,400	1,530	1,930	0,480	2,640	3,120
	0,120	1,160	1,280	0,410	1,820	2,230	0,530	2,980	3,510
	0,070	1,040	1,110	0,330	1,300	1,630	0,400	2,340	2,740
$\bar{x}$	0,092	1,094	1,186	0,380	1,562	1,942	0,472	2,656	3,128
s	0,031	0,067	0,066	0,031	0,237	0,260	0,053	0,301	0,323
$s_{\bar{x}}$	0,014	0,030	0,029	0,014	0,106	0,116	0,024	0,135	0,144

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern nach Applikation(i.p.)von 500 mg/kg Nicotinamid im Intervall von 12 Stunden.Die Angabe der Werte erfolgte in mμ mole/mg Prot.Zelle. Zeitpunkt: 48 Stunden nach der ersten Applikation.

also zu einer Tachyphylaxie. Dieser Ausdruck der alten Pharmakologen sagt aber nichts über den Wirkungsmechanismus aus. Der beobachtete Abfall der NADP-Konzentration ist deshalb bemerkenswert, weil die Nucleosidasen durch die hohen Dosen von Nicotinamid gehemmt sein sollten.

Offenbar können daher durch Nicotinamid hemmbare Nucleosidasen nicht für den Abbau des NADP unter den gewählten Versuchsbedingungen verantwortlich sein. Hier ergibt sich ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Der Anstieg der Pyridinnucleotide nach Gabe von Nicotinamid könnte entweder mit einer Hemmung des Abbaues der Pyridinnucleotide oder mit einem erhöhten Aufbau erklärt werden. Vielleicht spielen beide Vorgänge bei dem Zustandekommen des Effektes eine Rolle. Falls der Anstieg über einen vermehrten Aufbau von Pyridinnucleotiden zustandekommt - was wohl anzunehmen ist - kann der Vorgang auch bei mehrfacher Applikation von Nicotinamid dann zum Stillstand kommen, wenn der Vorrat an anderen Vorstufen die zur Synthese benötigt werden, erschöpft ist. Dies könnte die Resultate der chronischen Versuche erklären. Umgekehrt bleibt auch die Frage, warum NADP sehr viel weniger ansteigt als NAD, wenn doch NADP aus NAD entsteht und eine Art Gleichgewicht vorliegt. Auch hier gibt das Modell des Nicotinamid-Effektes einen Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen.

2) Einfluß von 6-Amino-Nicotinamid auf den Gehalt des NADP im Lebergewebe

Es ist bekannt, daß 6-AN als Antimetabolit des Nicotinsäureamid fungiert und es zur Bildung pathologischer Pyridinnucleotide nach Applikation von 6-AN kommt (HERKEN et al., 42, 45, 46; DIETRICH et al., 44; JOHNSON et al., 43). Tab. 9 gibt NADP-Werte 15 Std. nach Applikation von 100 mg/kg 6-AN wieder. Dabei braucht die Konzentration von NADP nicht unbedingt erniedrigt zu werden, sondern es kann zu einer zusätzlichen Bildung des Analogen kommen, so daß der Gesamtgehalt von NADP und NADP-ähnlichen Verbindungen erhöht ist (COPER et al., 39; HERKEN, 40, 41; HERKEN u. U. NEUHOFF, 42). In den eigenen Versuchen mit Lebergewebe wurde kein Versuch gemacht, die Menge an gebildetem 6-AN-NADP zu bestimmen. Die Konzentration des hier allein interessierenden NADP war jedoch deutlich vermindert.
Da der Abfall sowohl das $NADP^+$ als auch das $NADPH + H^+$ betraf, könnten die Befunde dafür sprechen, daß die Bildung von Analogen vor allem durch Austauschreaktion erfolgte.
Ein ähnliches Bild, wie es für die ganze Leberzelle gezeigt wurde, ergibt sich auch, wenn eine Aufschlüsselung in Mitochondrien-Fraktion und "supernatant"-Fraktion vorgenommen wird (Tab. 19).

15 Std. nach Applikation von 100 mg/kg 6-AN i.p. - einer sehr hohen Dosis - waren bereits einige Tiere gestorben. Die restlichen litten ohne Ausnahme an Diarrhoe und wiesen darüber hinaus Strecklähmungen auf. Die Lebern hatten dunkellivides Aussehen. In µmol/g Leberfrischgewicht umgerechnet, wird für das Gesamt-NADP, d.h. Summe aus Mitochondrien und "supernatant", ein Wert von 0,390 gefunden. Der Wert stimmt gut mit dem nach der Gefrierstop-Methode ermittelten überein. Aus den Daten der Tab. 19 geht ganz deutlich hervor, daß das Kompartment Mikrosomen und Hyaloplasma wesentlich stärker beeinflußt wird als das der Mitochondrien. Dieser Befund ist nicht überraschend, da die Umwandlung des NADP in das Analoge durch die Austauschreaktion in den Mikrosomen stattfindet. Eigenartigerweise sind jedoch die NADP-Werte in den Mitochondrien vollkommen normal, während sich beim $NADPH_2$ ein geringgradiger Abfall abzeichnet (nicht mehr als 20%). Auch in der "supernatant"-Fraktion wird die reduzierte Form des NADP von der 6-AN-Wirkung stärker betroffen als die oxydierte. Da die Austauschreaktion nur in der oxydierten Form erfolgen kann, muß sich nach dem Austausch und der damit verbundenen Erniedrigung von $NADP^+$ ein neues Gleichgewicht einstellen.

Tab. 19

N A D P - W E R T E NACH APPLIKATION VON 6-AMINO-NICOTINAMID

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
15	0,110	0,950	1,060	0,220	0,710	0,930	0,330	1,660	1,990	
	0,080	0,840	0,920	0,250	0,780	1,030	0,330	1,620	1,950	
	0,090	0,860	0,950	0,190	0,710	0,900	0,270	1,560	1,850	
	0,100	0,810	0,910	0,220	0,810	1,030	0,320	1,620	1,940	
	0,110	0,890	1,000	0,210	0,680	0,890	0,320	1,570	1,890	
	0,130	0,840	0,970	0,260	0,780	1,040	0,390	1,620	2,010	
	0,090	0,780	0,870	0,210	0,850	1,060	0,300	1,630	1,930	
	0,080	0,920	1,000	0,270	0,720	0,990	0,350	1,640	1,990	
$\bar{x}$	0,099	0,861	0,960	0,229	0,755	0,984	0,326	1,615	1,944	
s	±0,017	±0,056	±0,060	±0,028	±0,059	±0,068	±0,035	±0,034	±0,054	
$s_{\bar{x}}$	±0,006	±0,020	±0,021	±0,010	±0,021	±0,024	±0,012	±0,012	±0,019	

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern 15 Stunden nach einmaliger Applikation von 100 mg/kg 6-AN. Die Angabe der Werte erfolgte in mμ mole/mg Prot.Zelle .

3) Einfluß einer Ischämie auf den NADP-Gehalt der Leber

Zur Bestimmung von Pyridin-Nucleotiden in verschiedenen Geweben wird meist eine Methode benutzt, die eine schnelle Unterbrechung aller Lebensvorgänge gewährleistet und eventuell agonale Vorgänge ausschließt, z.B. Gefrierstop. Es interessiert daher, ob die schnelle Fixierung tatsächlich von entscheidender Bedeutung bei der Bestimmung dieser Co-Faktoren ist.
In den folgenden Untersuchungen wurden die Konzentrationen von NADP in der Leber unter Bedingungen gemessen, die besonders ungünstig sind. Auf diese Weise sollte ein Anhalt über die Schnelligkeit degradierender Vorgänge erhalten werden. Es wurden Untersuchungen über den Einfluß der Ischämie bei zwei weit auseinander liegenden konstant aufrecht gehaltenen Temperaturpunkten vorgenommen.

a) NADP-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" unter dem Einfluß einer Ischämie bei $+2^{o}C$

Unter diesen Bedingungen zeigen die Pyridinnucleotide eine nur langsame Abfallquote bis 48 Std. Ischämie-Dauer. Danach kommt es zu einem ziemlich abrupten NADP-Verlust in beiden Kompartments. Mehrere Stunden lang bleiben auch die ursprünglichen Relationen der Redox-Verhältnisse recht gut gewahrt (Tab. 20 bis 23).

b) NADP-Gehalt in Mitochondrien und "supernatant" unter dem Einfluß einer Ischämie bei +37°C

Die Lebern wurden in diesem Falle in einer feuchten Kammer in einem Brutschrank der konstanten Temperatur von +37°C ausgesetzt, bevor die Aufarbeitung in Mitochondrien und "supernatant" begann. Eine weitere Verfolgung der NADP-Werte nach einem Zeitraum von 4 Std. war unter diesen Bedingungen nicht möglich, da offensichtlich eine bereits beginnende Zerstörung der Zellstruktur eingetreten war, die eine zufriedenstellende präparative Trennung der Mitochondrien und des "supernatant" nicht zuließ. Schon nach einer Stunde lagen die NADP-Gesamtwerte unter diesen Bedingungen weit unter der Norm. Sie fallen nach 2 und 3 Std. Ischämie-Dauer weiter steil ab und betragen nach 4 Stunden nur noch weniger als 50% des Ausgangswertes (Tab. 24 bis 27). Demgegenüber sind beide Formen bei Temperaturen in der Nähe des Gefrierpunktes relativ stabil. Noch viele Stunden sind die Pyridinnucleotide natürlich bei Berücksichtigung eines gewissen Schwundes aber erhaltenen Redox-Relationen in den einzelnen Kompartments meßbar. Zudem konnten die oben beschriebenen präparativen Schwierigkeiten nicht beobachtet werden. Die hier beschriebenen Befunde korrelieren gut mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die unter ähnlichen Bedingungen

von WEDELL, MERKER (34) und MERKER, WEDELL, NEUBERT (35) durchgeführt wurden. Dabei zeigt sich im elektronenmikroskopischen Bild bereits nach 60 min. eine beginnende Mitochondrien-Schwellung, die nach 90 min. voll ausgeprägt ist. Zur gleichen Zeit sind schwere Veränderungen nur an der Kernstruktur zu finden. Nach 3 Std. sind die Christae der Mitochondrien schon vesikulär zerfallen. Bei Ischämie-Dauer über fünf Std. sind von den Mitochondrien nur noch leere Partikelsäcke übriggeblieben, in denen sich dann partiell Ansammlungen vereinzelter Christae-Bruchstücke befinden. Auch mit der von HOEHNE (36) durchgeführten Untersuchung des NAD-Gehaltes besteht eine gute Übereinstimmung.

Die bei Gefrierpunkt-Nähe und über viele Stunden anhaltende relative Stabilität der Triphosphopyridinnucleotide stellt eigentlich eine gute Grundlage dafür dar, Messungen dieser Art unter den Gegebenheiten der Pathologie durchzuführen. Ohne größere Bedenken ließen sich durch zu ermittelnde Korrekturfaktoren Rückschlüsse auf in vivo-Verhältnisse machen.

Tab. 20

I S C H Ä M I E - V E R S U C H BEI +2° C

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"				
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+$+	$NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+$+	$NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+$+$NADPH_2$(M+S)
12	0,150	1,190		1,340	0,260	1,040		1,300	0,410	2,230	2,640
	0,140	1,000		1,140	0,250	1,280		1,530	0,390	2,280	2,670
	0,090	1,050		1,140	0,360	0,910		1,270	0,450	1,960	2,410
	0,160	1,080		1,240	0,270	1,310		1,580	0,430	2,390	2,820
	0,070	1,130		1,200	0,230	1,370		1,600	0,300	2,500	2,800
	0,110	0,990		1,100	0,390	1,200		1,590	0,500	2,190	2,690
$\bar{x}$	0,120	1,073		1,193	0,293	1,185		1,478	0,413	2,253	2,672
s	±0,033	±0,077		±0,037	±0,055	±0,177		±0,152	±0,057	±0,135	±0,147
$s_{\bar{x}}$	±0,015	±0,032		±0,036	±0,027	±0,072		±0,062	±0,027	±0,075	±0,060

NADP- Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern unter den Bedingungen der Ischämie.
Die Werte sind in mμ mole/mg Prot. Zelle angegeben.
Ischämiedauer: 12 Stunden.

Abb. 3 zeigt die graphische Darstellung dieser Versuchsergebnisse.

Tab. 21

I S C H Ä M I E - V E R S U C H BEI +2° C

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+3)	$NADPH_2$(M+3)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+3)	
24	0,140	0,950	1,090	0,340	0,880	1,220	0,480	1,830	2,310	
	0,190	1,130	1,320	0,270	1,010	1,280	0,460	2,140	2,600	
	0,150	1,080	1,230	0,200	0,910	1,110	0,350	1,990	2,340	
	0,170	1,030	1,200	0,240	1,040	1,280	0,410	2,070	2,480	
	0,110	0,890	1,000	0,260	1,200	1,460	0,370	2,090	2,460	
	0,140	0,920	1,060	0,250	1,170	1,420	0,390	2,090	2,480	
$\bar{x}$	0,150	1,000	1,150	0,260	1,035	1,295	0,410	2,035	2,445	
s	±0,028	±0,095	±0,120	±0,046	±0,131	±0,129	±0,051	±0,112	±0,106	
$s_{\bar{x}}$	±0,011	±0,039	±0,049	±0,019	±0,053	±0,053	±0,021	±0,046	±0,043	

NADP- Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern unter den Bedingungen der Ischämie.
Die Werte sind in mμ mole/mg Prot.Zelle angegeben.
Ischämiedauer 24 Stunden.

Tab. 22

I S C H Ä M I E - V E R S U C H BEI +2° C

	MITOCHONDRIEN		"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)
48	0,120	0,810	0,930	0,270	0,980	1,250	0,390	1,790	2,180
	0,280	0,780	1,060	0,210	0,860	1,070	0,490	1,640	2,130
	0,160	1,030	1,190	0,180	0,620	0,800	0,340	1,650	1,990
	0,250	0,970	1,220	0,200	0,780	0,980	0,450	1,750	2,200
	0,190	0,800	0,990	0,250	0,850	1,100	0,440	1,650	2,090
	0,160	0,850	1,010	0,220	0,730	0,950	0,380	1,580	1,960
$\bar{x}$	0,193	0,873	1,067	0,222	0,803	1,025	0,415	1,677	2,092
s	±0,061	±0,103	±0,115	±0,033	±0,124	±0,153	±0,055	±0,078	±0,099
$s_{\bar{x}}$	±0,025	±0,042	±0,047	±0,014	±0,050	±0,062	±0,022	±0,032	±0,040

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern unter den Bedingungen der Ischämie.
Die Werte sind in mμ mole/mg Prot. Zelle angegeben.
Ischämiedauer: 48 Stunden.

Tab. 23

I S C H Ä M I E - V E R S U C H BEI +2° C

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2^+$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
64	0,050	0,540	0,590	0,060	0,330	0,390	0,110	0,870	0,980	
	0,040	0,390	0,430	0,130	0,210	0,340	0,170	0,600	0,770	
	0,130	0,330	0,460	0,070	0,260	0,330	0,200	0,590	0,790	
	0,100	0,380	0,480	0,180	0,520	0,700	0,280	0,900	1,180	
	0,130	0,570	0,700	0,130	0,140	0,270	0,260	0,710	0,970	
	0,080	0,380	0,460	0,100	0,230	0,330	0,180	0,610	0,790	
$\bar{x}$	0,088	0,432	0,520	0,112	0,282	0,393	0,200	0,713	0,913	
s	±0,039	±0,098	±0,104	±0,045	±0,132	±0,155	±0,062	±0,140	±0,161	
$s_{\bar{x}}$	±0,016	±0,040	±0,042	±0,018	±0,054	±0,063	±0,025	±0,057	±0,066	

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern unter den Bedingungen der Ischämie.
Die Werte sind in mμ mole/mg Prot. Zelle angegeben.
Ischämiedauer 64 Stunden.

Tab. 24

I S C H Ä M I E - V E R S U C H BEI +37 °C

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+3)	$NADPH_2$(M+3)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+3)	
1	0,150	1,060	1,210	0,090	0,790	0,880	0,240	1,850	2,090	
	0,160	1,080	1,240	-	0,650	0,650	0,160	1,730	1,890	
	0,180	0,860	1,040	-	0,620	0,620	0,180	1,480	1,660	
$\bar{x}$	0,163	1,000	1,163	0,030	0,687	0,717	0,193	1,687	1,880	
s	±0,016	±0,122	±0,108	-	±0,091	±0,142	±0,042	±0,189	±0,215	
$s_{\bar{x}}$	±0,009	±0,070	±0,062	-	±0,052	±0,082	±0,024	±0,109	±0,124	

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern unter den Bedingungen der Ischämie bei konstanter Temperatur von +37°C .Die Werte sind in mμ mole/mg Prot. Zelle angegeben.
Ischämiedauer: 1 Stunde.

Abb. 4 zeigt die graphische Darstellung dieser Versuchsergebnisse.

Tab. 25

I S C H Ä M I E - V E R S U C H BEI +37°C

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
2	0,140	0,860	1,000	-	0,610	0,610	0,140	1,470	1,610	
	0,100	0,960	1,060	-	0,530	0,530	0,100	1,490	1,590	
	0,140	0,810	0,950	-	0,550	0,550	0,140	1,360	1,500	
$\bar{x}$	0,127	0,877	1,003	-	0,563	0,563	0,127	1,440	1,567	
s	±0,023	±0,077	±0,055	-	±0,042	±0,042	±0,023	±0,070	±0,059	
$s_{\bar{x}}$	±0,013	±0,044	±0,032	-	±0,024	±0,024	±0,013	±0,040	±0,034	

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern unter den Bedingungen der Ischämie bei konstanter Temperatur von +37° C. Die Werte sind in mμ mole/mg Prot. Zelle angegeben.
Ischämiedauer: 2 Stunden.

Tab. 26

I S C H Ä M I E - V E R S U C H BEI +37° C

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"		
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$ (M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$ (M+S)
3	0,110	0,680	0,790	-	0,520	0,520	0,110	1,200	1,310
	0,100	0,800	0,900	-	0,470	0,470	0,100	1,270	1,370
	0,130	0,630	0,760	-	0,460	0,460	0,130	1,090	1,220
$\bar{x}$	0,113	0,703	0,817	-	0,483	0,483	0,113	1,187	1,300
s	±0,016	±0,087	±0,074	-	±0,032	±0,032	±0,016	±0,091	±0,076
$s_{\bar{x}}$	±0,009	±0,050	±0,043	-	±0,019	±0,019	±0,009	±0,052	±0,044

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern unter den Bedingungen der Ischämie bei konstanter Temperatur von +37°C .Die Werte sind in mμ mole/mg Prot.Zelle angegeben.
Ischämiedauer: 3 Stunden.

Tab. 27

I S C H Ä M I E - V E R S U C H BEI +37° C

	MITOCHONDRIEN			"SUPERNATANT"			MITOCHONDRIEN + "SUPERNATANT"			
ZEIT(h)	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$	$NADPH_2$	$NADP^+ + NADPH_2$	$NADP^+$ (M+S)	$NADPH_2$(M+S)	$NADP^+ + NADPH_2$(M+S)	
4	0,090	0,510	0,600	-	0,420	0,420	0,090	0,930	1,020	
	0,090	0,540	0,630	-	0,400	0,400	0,090	0,940	1,030	
	0,070	0,500	0,570	-	0,250	0,250	0,070	0,750	0,820	
$\bar{x}$	0,083	0,517	0,600	-	0,357	0,357	0,083	0,873	0,957	
s	±0,012	±0,021	±0,030	-	±0,093	±0,093	±0,012	±0,107	±0,119	
$s_{\bar{x}}$	±0,007	±0,012	±0,017	-	±0,054	±0,054	±0,007	±0,062	±0,068	

NADP - Werte in Mitochondrien und "supernatant" von Rattenlebern unter den Bedingungen der Ischämie bei konstanter Temperatur von +37°C .Die Werte sind in mμ mole/mg Prot. Zelle angegeben.
Ischämiedauer: 4 Stunden.

D. Zusammenfassung

1) In Anlehnung an HOGEBOOM und SCHNEIDER wurde eine Methode zur Messung der Triphosphopyridinnucleotide in tierischem Gewebe ausgearbeitet.

2) Es wurden Messungen sowohl der oxydierten als auch der reduzierten Anteile der Triphosphopyridinnucleotide (A) in der Gesamtleber (Gesamthomogenat und Gefrierstop-Methode) und (B) nach Differentialzentrifugation in beiden Zellkompartments - in den Mitochondrien und im "supernatant" - vorgenommen und die mit verschiedenen Methoden gewonnenen Werte verglichen.

3) Nicotinamid in hohen Dosen (500 mg/kg) führt sowohl im Gesamthomogenat als auch in Mitochondrien und "supernatant" zu einem maximalen Anstieg der NADP-Werte 12 Std. nach einmaliger Applikation. Eine weitere Erhöhung ließ sich nach mehrfacher Applikation gleich hoher Dosen Nicotinamid nicht erzwingen. Verschiedene Deutungsmöglichkeiten für dieses Verhalten werden herangezogen.

4) Der Einfluß von 6-Amino-Nicotinamid auf den Gehalt des NADP im Gesamtlebergewebe und in der Zellfraktionierung (Mitochondrien und "supernatant") wurde untersucht. 16 Stunden nach einmaliger Gabe von 6-AN ist der Gehalt an oxydiertem und reduziertem NADP deutlich vermindert. Bei der Aufschlüsselung in Mitochondrien und "supernatant"

kann gezeigt werden, daß das Kompartment Mikrosomen und Hyaloplasma wesentlich stärker beeinflußt wird als die Mitochondrien. Ein Bildungsmodus für die unter dem Einfluß von 6-AN entstehenden Analogen der Triphosphopyridinnucleotide (6-AN-NADP) wird diskutiert.

5) Eine Untersuchung über den Einfluß der Ischämie auf den NADP-Gehalt des Lebergewebes bei unterschiedlichen Temperaturpunkten zeigt, daß die Werte bei $+2^{o}C$ längere Zeit relativ konstant und auch die Redoxverhältnisse von $NADP^{+}/NADPH_2$ recht gut gewahrt bleiben. Hingegen wird ein stärkerer Abfall der Pyridinnucleotide unter dem Einfluß der Ischämie bei $+37^{o}C$ beobachtet.
Nach 4 Stunden beträgt der Gehalt an NADP nur noch weniger als 50% des Ausgangswertes. Limitierend für die Messungen über einen längeren Zeitraum ist eine bereits einsetzende Zerstörung der Zellstruktur.

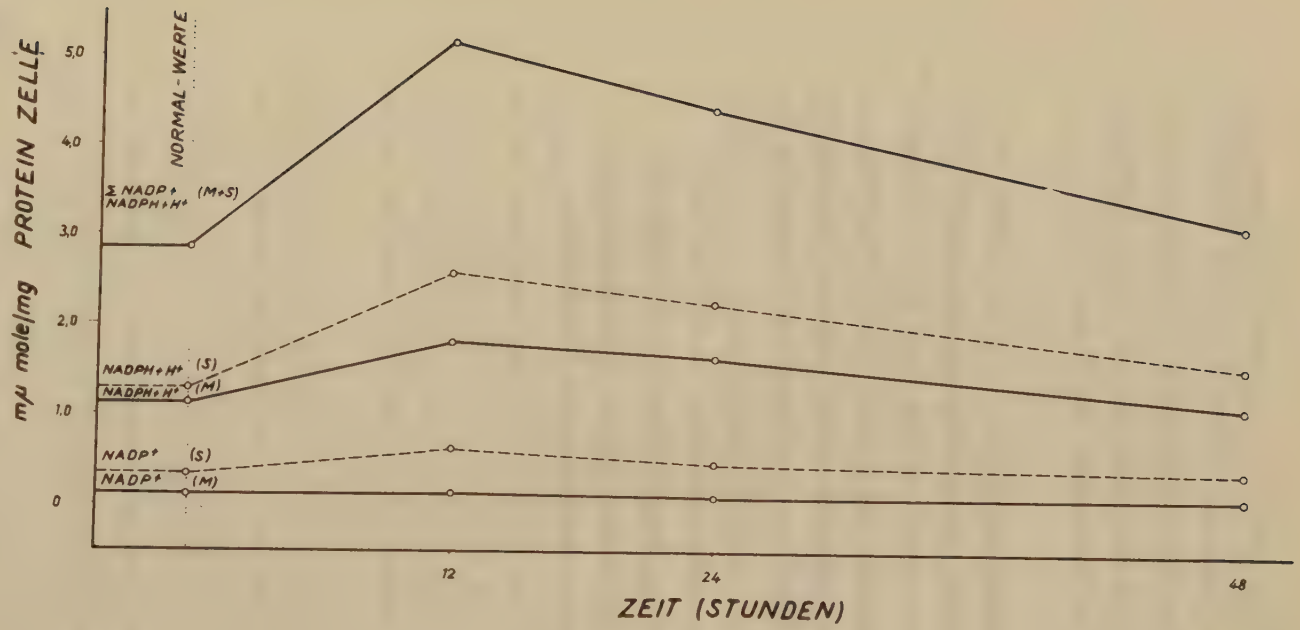

Abb. 2

NADP - GEHALT IN MITOCHONDRIEN UND „SUPERNATANT" VON RATTENLEBERN NACH APPLIKATION VON 500 mg/kg NICOTINAMID (i.p) IM INTERVALL VON 12 STUNDEN

M = MITOCHONDRIEN
S = „SUPERNATANT"

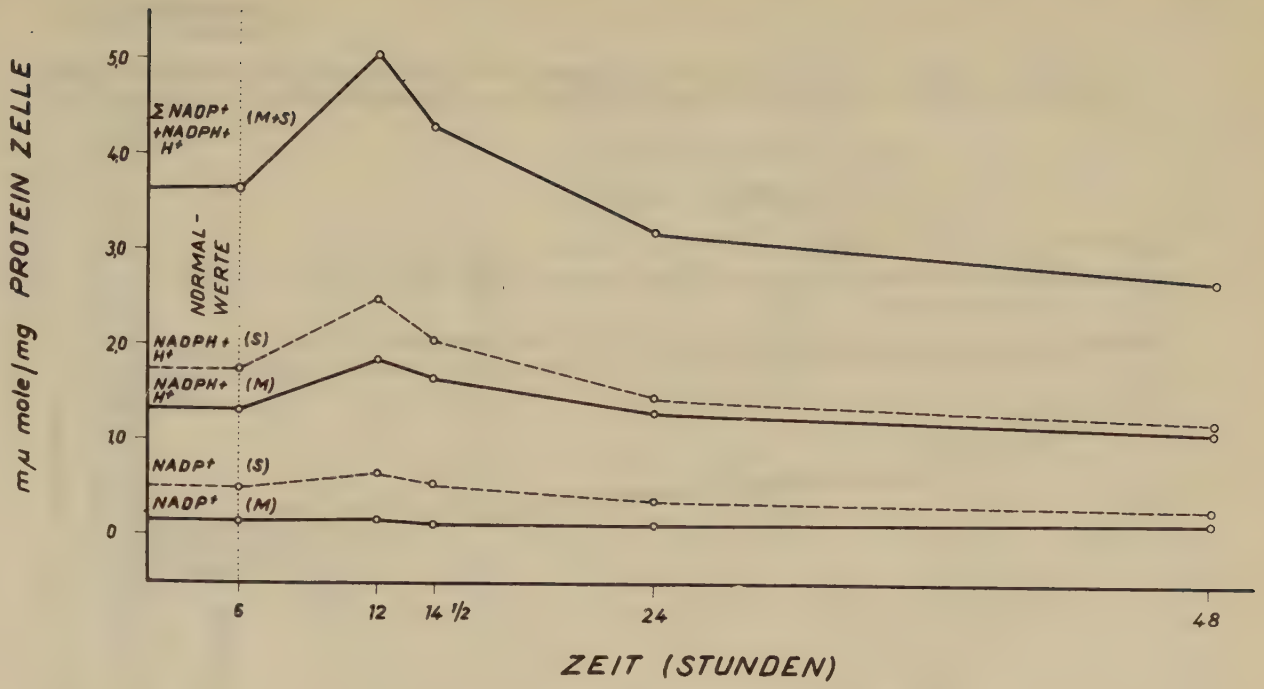

Abb. 1

NADP-GEHALT IN MITOCHONDRIEN UND „SUPERNATANT" VON RATTENLEBERN 6 BIS 48 STUNDEN NACH EINMALIGER GABE VON 500 mg/kg NICOTINAMID (i.p.)

M = MITOCHONDRIEN
S = „SUPERNATANT"

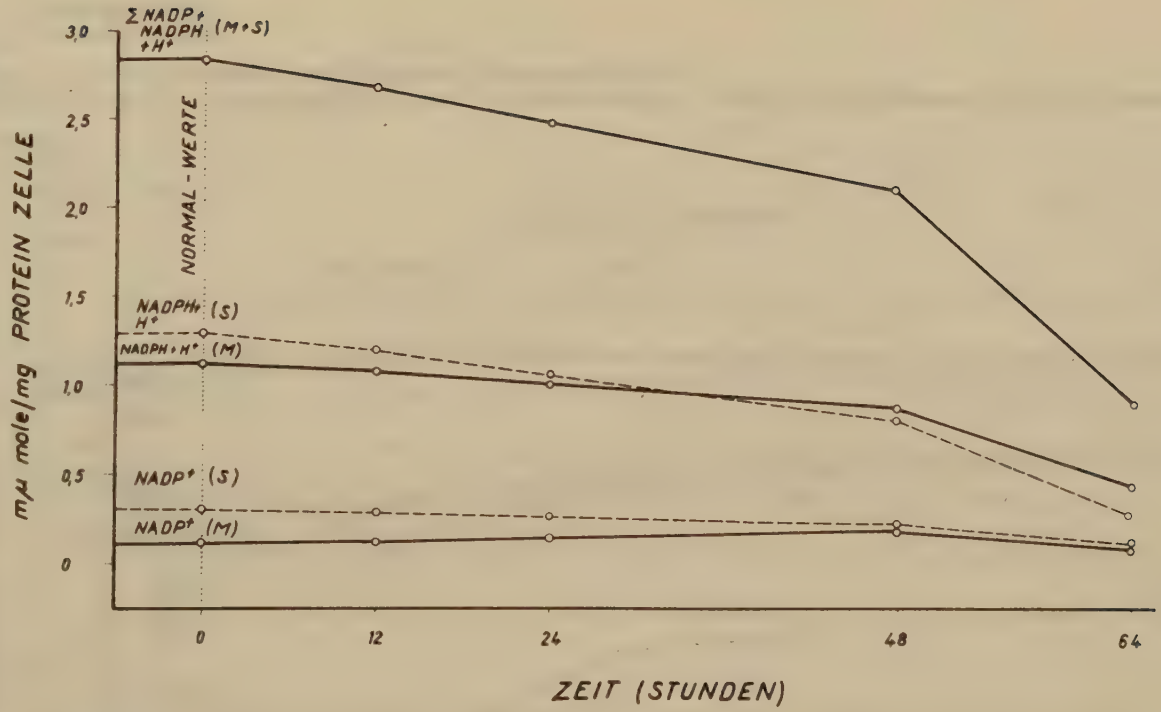

Abb. 3

NADP-GEHALT IN MITOCHONDRIEN UND „SUPERNATANT" VON RATTENLEBERN UNTER DEN BEDINGUNGEN DER ISCHÄMIE BEI +2°C ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 12 BIS 64 STUNDEN

M = MITOCHONDRIEN
S = „SUPERNATANT"

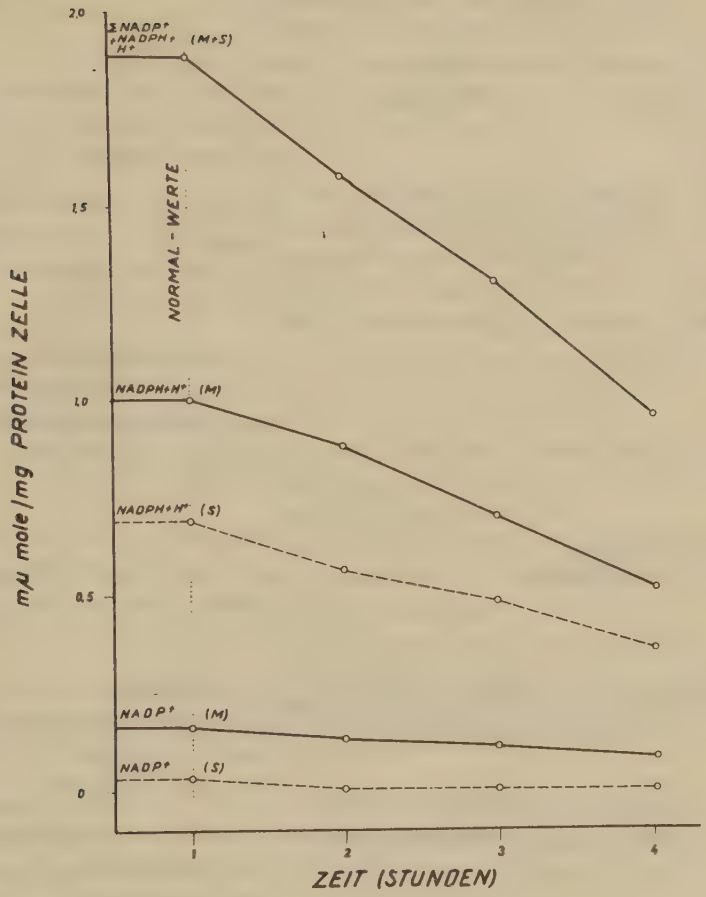

Abb.4

NADP - GEHALT IN MITOCHONDRIEN UND „SUPERNATANT" VON RATTEN-LEBERN UNTER DEN BEDINGUNGEN DER ISCHÄMIE BEI + 37° C UBER EINEN ZEITRAUM VON 1 BIS 4 STUNDEN

M = MITOCHONDRIEN
S = „SUPERNATANT"

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) BASSHAM, J.A., BIRT, L.M., HEMS, R., LOENING, U.E.: Determination of the Reduced and Oxidized Pyridine Nucleotides in Animal Tissue. Biochem. Journal 73, 491 (1959)

(2) BIRT, L.M., BARTLEY, W.: The Behaviour of Pyridine Nucleotides of Mitochondria in a "Saline Medium". B.J. 76, 323 (1960)

(3) BIRT, L.M., BARTLEY, W.: The Distribution and Metabolism of Intra- and Extra-Mitochondrial Pyridine Nucleotides in Suspensions of Liver Mitochondria. B.J. 75, 303 (1960)

(4) BURCH, H.B., LOWRY, O.H., V.DIPPE, P.: The Stability of Triphospho-pyridine Nucleotide and Its Reduced Form in Rat Liver. J.B.C. 238, 2838 (1963)

(5) CAIGER, P., MORTON, R.K., FILSELL, O.H., JARRET, I.G.: A Comparative Study of Nicotin-amide Nucleotide Coenzymes during Growth of Sheep and Rat. B.J. 85, 351 (1962)

(6) BRODIE, B.B., GILETTI, J.R., LA DU, B.N.: Enzymatic Metabolism of Drugs and other Foreign Compounds. Ann.Rev.Biochem. 27, 427-454 (1958)

(7) HOGEBOOM, G.H., SCHNEIDER, W.C., PALLADE, G.E.: Cytochemical Studies of Mammalian Tissues - Isolation of intact Mitochondria from Rat-Liver; Some Biochemical Properties of Mitochondria and submicroscopic Particulate Material. J.B.C. 172, 619 (1946)

(8) VERKHEISER, W.C., HARTLEY, W.: The Study of Steady-State Concentrations of Internal solution of Mitochondria by Rapid Centrifugal Transfer to a Fixation Medium. B.J. 66, 79 (1959)

(9) DESSELBERGER Die oxydierten und reduzierten Pyridinnucleotide in der Niere und Leber nach Applikation von 6-Amino-Nicotinamid und Triamteren. Inauguraldissertation; Berlin, 1966

(10) KLINGENBERG, M., SLENCZKA, W., RITT,E.: Vergleichende Biochemie der Pyridinnucleotide in Mitochondrien verschiedener Organe. B.Z. 331, 486 (1959)

(11) HOGEBOOM, G.H.: Fractionation of Cell Components of Animal Tissues. General Method for the Isolation of Liver Cell Components. Methods in Enzymology 1, 16 (1955) Academic Press, Inc., New York

(12) HOLTON, F.A., HÜLSMANN, W.C., MYERS, D.K., SLATER,E.L. A Comparison of the Properties of Mitochondria Isolated from Liver and Heart. B.J. 67, 579 (1957)

(13) HOHORST, H.-J.: D-Glucose-6-phosphat und D-Fructose-6-phosphat. H.-U. Bergmeyer - Methoden der enzymatischen Analyse Verlag Chemie - Weinheim/Bergstr., 1962, S. 134

(14) KAUFMANN, B.T., KAPLAN, N.O.: Mechanism of Depletion of Mitochondrial Pyridine Nucleotides. B.B.A. 39, 332 (1960)

(15) GREENGARD, P.: Hormonal Effects on DPN-Concentration in Rat-Liver. Biochim. Biophys. Acta 47, 614

(16) KLINGENBERG, M.: Zur Bedeutung der freien Nucleotide Pyridin-Nucleotide und biolog. Oxydation. 11. Colloquium Mosbach, April 1960 Heidelberg, Springer-Verlag 1960, S. 82

(17) LOWRY, O.H., PASSOUNEAU, J.V., SCHULZ, D.W., ROCK, M.K.: The Measurement of Pyridine Nucleotides by Enzymatic Cycling. J.B.C. 236, 2746 (1961

(18) AXELROD, J.: Biochemical Factors in the Activation and Inactivation of Drugs; in: Verhandlungen der Deutsch.Pharm. Gesellschaft, 25. Tagung in Basel v. 29. Sept. - 2. Okt. 1959 Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Path. u. Pharmak. 238, 1 (1960)

(19) MYERS, D.K., SLATER, E.C.: The Enzymatic Hydrolysis of Adenosine Triphosphate by Liver Mitochondria. B.J. 67, 558 (1957)

(20) NEUBERT, D., SCHULZ, H.-U., HOEHNE, R.: Stability of nicotinamidadenine dinucleotide phosphate and nicotinamide-adenine dinucleotide in tissue extracts under mildly acid condition. B.B.A. 99, 610 (1965)

(21) PURVIS, J.L.: Pyridine Nucleotides in Rat Liver Mitochondria.
B.B.A. 38, 435 (1960)

(22) SCHNEIDER, W.C.: Intracellular Distribution of Enzymes. The Oxidation of octanoic acid by Rat-Liver-Fractions.
J.B.C. 176, 259 (1948)

(23) BORST, P.: Hydrogentransport and Transport Metabolites - Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle.
Springer-Verlag, 1963, p. 137

(24) ANFINSEN, C.B.: A Micromanometric Method for the Determination of Diphosphopyridine Nucleotide.
J. Biol. Chem. 152, 285 (1944)

(25) GLOCK, G.E., MC LEAN, P.: Effects of Hormones on Levels of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Triphosphopyridine Nucleotide in Liver and Diaphragm.
B.J. 61, 397 (1955)

(26) GLOCK, G.E., MC LEAN, P.: The Determination of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Triphosphopyridine Nucleotide in Animal Tissue.
B.J. 61, 388 (1955)

Levels of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Triphosphopyridine Nucleotide in Animal Tissues.
B.J. 61, 381 (1955)

(27) SCHNEIDER, W.C., HOGEBOOM, G.H.: Cytochemical Studies of Mammalian Tissues: The Isolation of Cell Compartments by differential Centrifugation. A Review Cancer Res. 11, 1 (1951)

(28) HOLZER, H., BUSCH, D., KRÖGER, H.: Enzymatisch-optische Bestimmung von TPNH und TPN neben DPNH und DPN. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 313, 184 (1958)

(29) NEUBERT, D., und HOFFMEISTER, J.: Intrazelluläre Lokalisation von Fettsubstanzen bei experimenteller Leberverfettung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 237, 519 (1960)

(30) JACOBSON, K.B., KAPLAN, N.O.: Pyridine Coenzymes of subcellular Tissue Fractions. J.B.C. 226, 603 (1957)

(31) JEDEIKIN, L.A., WEINHOUSE, S.: Metabolism of Neoplastic Tissue - Assay of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide in Normal and Neoplastic Tissue. J.B.C. 213, 271 (1955)

(32) KLINGENBERG, M., und SLENCZKA, W.: Pyridinnucleotide in Lebermitochondrien - Eine Analyse ihrer Redoxbeziehungen. B.J. 331, 486-517 (1959)

(33) EULER, H.v., F. SCLENK, H. HEIWINKEL und B. HÖGBERG — Cozymase-und Nicotinsäureamid-Gehalt im Tierkörper und in der Hefe. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 256, 208 (1938)

(34) WEDELL, J. und H.-J. MERKER — Atmungskettenphosphorylierung und Mitochondrienstruktur nach anoxischem Herzstillstand. Verh. dtsch. Ges. Kreisl.-Forschung Band 30, 201 (1964)

(35) MERKER, H.-J., J. WEDELL und D. NEUBERT — Biochemische und strukturelle Veränderungen an den Zellorganellen der Leber nach vollständiger Kreislaufunterbrechung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 249, 85 (1964)

(36) HOEHNE, R. — Untersuchungen über den Gehalt an oxydiertem und reduziertem Diphosphopyridinnucleotid(Nicotinsäureamid - Adenin - Dinucleotid) in verschiedenen Zellfraktionen. Inauguraldissertation, Berlin 1966

(37) NEUHOFF, V. — Verfahren zur quantitativen Extraktion der oxydierten und reduzierten Pyridinnucleotide aus Geweben. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. u. Pharmak. 250, 302-306(1965)

(38) NEUHOFF, V. und E. DESSELBERGER — Bestimmung und Stabilität von Pyridinnucleotiden in Organextrakten. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 252, 43-49(1965)

(39) COPER, H., HADASS, H. und H. LISON
Dosis-Wirkungsbeziehung beim 6-Amino-Nicotinamid (6-AN). Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 253, 27 (1966)

(40) HERKEN, H.
Die Wirkung von Antimetaboliten auf den Zellstoffwechsel des Warmblüters. Der Internist, 7.Jg., 8, 375(1966)

(41) HERKEN, H.
Biosynthesis and action of Dinucleotides containing 6-Amino-nicotinamide on Membrane Transport Processes. Arzneimittelforschung 18.Jg., 10, 1235 (1968)

(42) HERKEN, H. und V. NEUHOFF
Spectrofluometrische Bestimmung des Einbaues von 6-Aminonicotin-säure-Amid in die oxydierten Pyridinnucleotide der Niere. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 247, 187-201(1964)

(43) JOHNSON, W.J. and J. D. Mc COLL
Antimetabolite activity of 6-amino-nicotinamide. Federation Proceedings 15, 284(1956)

(44) DIETRICH, L. S., J. M. FRIEDLAND, and L. A. KAPLAN
Pyridine Nucleotide Metabolism: Mechanism of action of the Niacin Antagonist, 6 Aminonicotinamide. J. biol. Chem. 233, 964 (1958)

(45) HERKEN, H., G. SENFT und B. ZEMISCH
Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes durch Biosynthese 6-Aminonicotin-säureamid enthaltender Nucleotide. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 249, 54-70 (1964)

(46) HERKEN, H. G. SENFT und B. ZEMISCH
Der Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Verteilung der Natrium- und Kaliumionen zwischen dem extra- und intrazellulären Raum in der Leber- und der Skelettmuskulatur. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 253, 364-371 (1966)

(47) GLOCK, G. E., and Mc LEAN, P.
The intracellular Distribution of Pyridine Nucleotides in Rat-Liver. Exp. Cell. Res. II , 234 (1956)

(48) FISCHER, A., and F. SCHLENK
Determination of codehydrogenase I (cozymase) in tumor tissues. Tex. Rep. Biol. Med. 6, 346-353 (1948)

(49) WARBURG, O. und W. CHRISTIAN
Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten. Biochem. Z. 287, 291 (1936)

(50) WARBURG, O., CHRISTIAN, W. und A. GRIESE
Wasserstoffübertragendes C-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. Biochem. Z. 282, 157 (1935)

(51) EULER, H.v., H. ALBERS und F. SCHLENK
Chemische Untersuchungen an hochgereinigter Co-Zymase. Z. physiol. Chemie Hoppe-Seyler's 240, 113 (1936)

(52) MYRBÄCK, K., EULER, H.v.
Gärungs-Co-Enzym (Co-Zymase) der Hefe. Z. physiol. Chemie Hoppe-Seyler's 138, 1 (1924)

(53) WARBURG, O. und W. CHRISTIAN — "Co - Fermentproblem" Biochem. Z. 274, 112 (1934)

(54) ADLER, E., HELLSTRÖM, H. und H.v. EULER — Zur Kenntnis der Reduktion der Co - Zymase. Z. physiol. Chemie Hoppe-Seyler's 242, 225 (1936)

Herrn Professor Dr. med. H. HERKEN danke ich für die Überlassung der zur Durchführung dieser Arbeit notwendigen Mittel.

Herrn Professor Dr. med. D. NEUBERT sage ich für die Überlassung der Thematik und die freundliche Unterstützung meinen besten Dank.

L e b e n s l a u f

Am 29.8.1937 wurde ich als Sohn des Fleischermeisters Willy Schulz und seiner Ehefrau Else, geb. Kühn, in Schwiebus im Kreise Züllichau-Schwiebus geboren. 1945 im Zuge der Vertreibung aus den Ostgebieten Übersiedlung nach Friedland in der Niederlausitz, wo ich 1952 die dortige Grundschule absolvierte. Oberschulbesuch (naturwissenschaftlicher Zweig) mit abschließendem Abitur in Frankfurt (Oder). Einjähriger Vorbereitungskurs im Goethe-Gymnasium in Berlin-Wilmersdorf zwecks Anerkennung des Ostabiturs. 1961 Übersiedlung gemeinsam mit der ganzen Familie nach West-Berlin. Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. Physikum 1963. Nach sechs weiteren klinischen Semestern Staatsexamen. Anschließende Medizinalassistentenzeit in verschiedenen Berliner Krankenanstalten und zehn Monate im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin. Vom 1. Oktober 1968 bis zum 31. August 1969 Assistent am Pathologischen Institut der Christian-Albrecht-Universität in Kiel. Seit dem 1. September 1969 arbeite ich am Pharmakologischen Institut der Medizinischen Hochschule in Hannover.

Druck: Druckerei der Tierärztlichen Hochschule Hannover